

655

COUNTWAY LIBRARY



HC 6EGM

BOSTON
MEDICAL LIBRARY
8 THE FENWAY

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

8600-1

9

ARCHIV

FÜR

PERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER

PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER

EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. L. LENDLE

PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

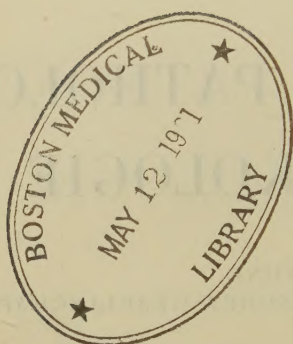
223. BAND

MIT 174 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG

1954



Alle Rechte vorbehalten.

Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.

Printed in Germany.

Druck : Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.

Inhalt des 223. Bandes.

	Seite
Altmeyer, H., s. Keiderling, W. und F. Wöhler.	
Bänder, A., Über zwei chromaffine Zelltypen im Nebennierenmark und ihre Beziehung zum Vorkommen von Adrenalin und Arterenol. Mit 5 Textabbildungen	140
Barton, H., U. Heine, A. Graffi und F. Jung, Versuche zur Beeinflussung der Cancerogenese durch 1-Isopropyl-5-methyl-azulen. Mit 6 Textabbildungen	443
Benitz, K.-F., Zur Histochemie der sogenannten experimentellen Arteriosklerose. Mit 1 Textabbildung	420
Benthe, H. F., Die dromotrope Coffeinwirkung am Herzmuskel des Frosches als Kalium-Sensibilisation. Mit 5 Textabbildungen	285
Bergmann, M., Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Gallensäuren und Scopolamin-N-butylbromid (Buscopan) auf die Motorik des Darmes	311
Borsi, F., s. Herr, F., und G. Pataky.	
Brock, N., und H. Druckrey, Zur pharmakologischen Charakterisierung vegetativer Pharmaka am Gewebsstoffwechsel der Speicheldrüse. I. Spasmodytica und „Ganglienblocker“. Mit 3 Textabbildungen	314
—, J. Kottmeier, D. Lorenz und H. Veigel, Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen im Tierversuch. Ein Beitrag zur Prüfungsmethodik entzündungswidriger Substanzen. Mit 7 Textabbildungen	450
Brüni, C., s. Meier, R., und J. Tripod.	
Brunner, H., s. Lüllmann, H.	
Busse, W., und H. Göing, Pharmakologische Beeinflussung der tertiären Reizbildung bei Überempfindlichkeit des Herzens gegen k-Strophanthidin nach Vorbehandlung mit Aconitin. Mit 4 Textabbildungen	37
—, s. Göing, H.	
Cleve, H., und F. Hartmann, Zur Entstehung von Nephrosen durch Plasmapherese am Hund. Mit 1 Textabbildung	198
Dittmar, H. A., K. Mechelke und E. Nusser, Über die Blutdruck- und Flußänderungen in der Arteria carotis communis und Aorta ascendens nach Arterenol und Adrenalin, sowie deren Beeinflussung durch Regitin. Mit 8 Textabbildungen	75
—, —, u. —, Über die Beeinflussung der bei Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion auftretenden Kreislaufveränderungen durch Regitin. Mit 6 Textabbildungen	89
Druckrey, H., s. Brock, N.	
Duensing, F., und W.-D. Erdmann, Hirnelektrische Untersuchungen über die Wirkung von Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (E 605) an Kaninchen und über einen begrenzten Antagonismus zwischen E 605 und Atropin an Katzen. Mit 4 Textabbildungen	506
Engelhorn, R., Über den Einfluß des Äthyl-Urethans und des Phenylcarbaminsäure-isopropylesters auf das Lungengewebe der Ratte	177
Erdmann, W.-D., und K. P. Schaefer, Über die Wirkung von Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (E 605) auf Rückenmarksreflexe an der Katze. Mit 5 Textabbildungen	519

—, s. Duensing, F.

Erdös, E. G., s. Werle, E.

Frey, J., und J. Schirmeister, Die renale Wasserausscheidung bei oraler Aufnahme größerer Wassermengen (Wasserdurese). Mit 2 Textabbildungen 117

—, —, Über Besonderheiten der Filtrationsdiurese. Mit 2 Textabbildungen 122

—, — und **H. Henning**, Die „Clearance der Harnfixasumme“ (C_Σ) unter verschiedenen Absonderungsarten der gesunden Nieren und ihre Beziehungen zur renalen Wasserbearbeitung. Mit 6 Textabbildungen 107

Göing, H., und W. Busse, Erzeugung einer Strophanthinüberempfindlichkeit des Herzens durch Aconitin. Mit 1 Textabbildung 19

—, s. Busse, W.

Göltner, E., s. Schwab, M., R. Koch, K.-E. Koch und H. Riggert.

Graffi, A., s. Barton, H., U. Heine und F. Jung.

Habermann, E., Untersuchungen über die Hemmung der Blutgerinnung durch Bienengift. Mit 2 Textabbildungen 182

—, und **E. Mölbert**, Zur morphologischen Differenzierung der Hämolyse durch Bienengift, Schlangengift, Lysocithin und Digitonin. Mit 10 Textabbildungen 203

—, und **W. Neumann**, Beiträge zur Charakterisierung der wirksamen Komponenten von Schlangengiften. Mit 4 Textabbildungen 388

Hartmann, F., s. Cleve, H.

Heine, U., s. Barton, H., A. Graffi und F. Jung.

Henning, H., s. Frey, J., und J. Schirmeister.

Held, L., und H. Maske, pH-Messungen im lebenden Gewebe mit besonderer Berücksichtigung des Pankreas. Mit 1 Textabbildung 158

Herr, F., J. Borsi und G. Pataky, Wirkung der Umwelttemperatur auf die Toxizität der Analgetica. Mit 2 Textabbildungen 56

Hinrichs, K., H. Poppe, H. Steyer und H. Weidemann, Papierchromatographischer Nachweis von Conteben 493

Höfler, W., s. Pichotka, F., und J. Reissner.

Jung, F., s. Barton, H., U. Heine und A. Graffi.

Junkmann, K., Über protrahiert wirksame Gestagene. Mit 1 Textabbildung 244

—, Über protrahiert wirksame Corticoide 280

Keiderling, W., F. Wöhler und H. Altmeyer, Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens. II. Mitteilung. Tierexperimentelle Untersuchungen über Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber und Milz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Mit 4 Textabbildungen 375

Kempe, H. D., Hirngefäßreaktionen bei der experimentellen Vergiftung mit E 605 (Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat). Mit 4 Textabbildungen 533

—, Untersuchungen zur Frage der strukturellen Verwandtschaft von Morphin und Papaverin mit Hilfe des Nalorphin-Antagonismus. Mit 4 Textabbildungen 541

Kessel, M., P. Körtge und F. A. Pezold, Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien. II. Mitteilung. Verhalten der Bromsulphaleinausscheidung beim Kaninchen unter chronischer Allylformiatvergiftung. Mit 1 Textabbildung 127

Kewitz, H., und K. Morgan, Über die Bedeutung des Histamins für die Phagocytose und Tuschepartikelchen durch Endothelien. Mit 14 Textabbildungen 399

Kleinsorg, H., s. Krüskemper, H.-L.

Koch, K.-E., s. Schwab, M., R. Koch, E. Göltner und H. Riggert.

Koch, R., s. Schwab, M., K.-E. Koch, E. Göltner und H. Riggert.	
Kolder, H., Explosive Überdruckdekompression	486
Körtge, P., s. Kessel, M., und F. A. Pezold.	
Kottmeier, J., s. Brock, N., D. Lorenz und H. Veigel.	
Kracht, J., Zur Dauer der Nebennierenrinden-Aktivierung nach ACTH und ACTH-Depot. Mit 1 Textabbildung	355
Kramer, M., Zur Differenzierung der Receptoren für den BEZOLD-JARISCH-Reflex. Mit 5 Textabbildungen	148
Krüskemper, H.-L., und H. Kleinsorg, Zur antithyreoidalen Wirkung von Kaliumperchlorat. Mit 6 Textabbildungen	469
Künzer, W., und D. Saffer, Vergleichende Untersuchung der Denaturierung sowie Oxydation von fetalem und Erwachsenen-Oxy-Hämoglobin durch Kaliumchlorat. II. Mitteilung. Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrocyten. Mit 2 Textabbildungen	501
Kuschinsky, G., und E. Muscholl, Die Behandlung der experimentellen Quecksilbervergiftung mit 2,3 Dimercaptopropionsäure. Mit 2 Textabbildungen	408
—, H. Lüllmann und E. Muscholl, Untersuchungen über die Einwirkung von verschiedenen Pharmaka auf die Spontanrhythmik des isolierten Hühneramnion. Mit 3 Textabbildungen	369
Langecker, H., Die Verteilung von Inulin und Dextran auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund. IV. Mitteilung. Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung.	495
—, und W. Prescher, Das Schicksal von 17-α-Oxyprogesteron im menschlichen Organismus. Mit 1 Textabbildung	306
Leppelmann, H.-J., und A. Loeser, Über die Wirkung von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol auf glattmuskuläre Organe. Mit 1 Textabbildung	332
Loeser, A., s. Leppelmann, H.-J.	
Lorenz, D., s. Brock, N., J. Kottmeier und H. Veigel.	
Lüllmann, H., und H. Brunner, Ein isoliertes Nerv-Muskelpreparat des M. serratus der Ratte. Mit 3 Textabbildungen	254
—, s. Kuschinsky, G., und E. Muscholl.	
Mankel, A., s. Zorn, B.	
Markwardt, F., s. Repke, K.	
Maske, H., s. Held, L.	
Meier, R., J. Tripod und C. Brüni, Änderung der blutdrucksenkenden Wirkung von Apresolin und Neprosol durch Reaktion mit Serumbestandteilen. Mit 7 Textabbildungen	338
—, s. Schuler, W.	
Mechelke, K., und E. Nusser, Vergleichende Untersuchungen der Kreislaufwirkung von Sympatol, P-Oxyphenylaminoethanol-campfersulfonat (POPC) und Veritol beim gesunden Menschen. Mit 4 Textabbildungen	100
—, —, s. Dittmar, H. A.	
Mölbelt, E., s. Habermann, E.	
Morgan, K., s. Kewitz, H.	
Muscholl, E., s. Kuschinsky, G.	
—, —, und H. Lüllmann.	
Neumann, W., s. Habermann, E.	
Nowy, H., Über die Altersabhängigkeit der tödlichen Strophanthindosis bei der Ratte	165
Nusser, E., s. Dittmar, H. A., und K. Mechelke.	

—, s. Mechelke, K.	
Pataki, G., s. Herr, F., und J. Borsi.	
Pezold, F. A., s. Kessel, M., und P. Körtge.	
Pezold, F. A., s. Kessel, M., und P. Körtge.	
Pichotka, J., W. Höfler und J. Reissner, Untersuchungen über die Wasserbindung in organischen Systemen. III. Die Gefrierpunkte überlebender Warmblütergewebe	217
Poppe, H., s. Hinrichs, K., H. Steyer und H. Weidemann.	
Porro, A., Quantitative Veränderungen in den Nucleotiden einiger Organe des Meerschweinchens unter Wirkung des Adenosintri-phosphats (ATP). Mit 1 Textabbildung	465
Prescher, W., s. Langecker, H.	
Reissner, J., s. Pichotka, J., und W. Höfler.	
Repke, K., und F. Markwardt, Versuche zum Lichteinfluß auf die jahreszeitliche Oestrusperiodizität. Mit 1 Textabbildung	259
—, Über fermentative Reduktion von Oestron	271
Riggert, H., s. Schwab, M., R. Koch, K.-E. Koch und E. Göltner.	
Saffer, D., s. Künzer, W.	
Schaefer, K. P., s. Erdmann, W.-D.	
Schaumann, W., Zur Wirkung der morphinähnlich wirkenden Analgetica auf den Meerschweinchendünndarm in situ. Mit 1 Textabbildung . . .	348
Schirmeister, J., s. Frey, J.	
—, —, und H. Henning.	
Schuler, W., und R. Meier, Enthemmende Wirkung von Metallen auf die hydrazingehemmte enzymatische Oxydation von Cadaverin.	169
Schwab, M., R. Koch, K.-E. Koch, E. Göltner und H. Riggert, Der Einfluß der Ammoniumchlorid-Acidose auf Gesamtwasser, extra- und intracelluläres Flüssigkeitsvolumen und extracelluläre Elektrolyse	425
Stave, U., Beiträge zum Studium der Bewegungsformen glattnuskeliger Organpräparate. Mit 6 Textabbildungen	294
Steyer, H., s. Hinrichs, K., H. Poppe und H. Weidemann.	
Tripod, J., s. Meier, R., und C. Brüni.	
Veigel, H., s. Brock, N., J. Kottmeier und D. Lorenz.	
Volkmer, E., Das Elektoretinogramm bei normalen und mit γ -Hexachlor-cyclohexan vergifteten Fröschen. Mit 3 Textabbildungen	481
Wallis, L., Die Beeinflussung des Membranpotentials der Gelatinemembran durch Formaldehyd. Mit 4 Textabbildungen	64
Weidemann, H., s. Hinrichs, K., H. Poppe und H. Steyer.	
Werle, E., und E. G. Erdös, Über eine neue blutdrucksenkende, darm- und uteruseregende Substanz im menschlichen Urin. Mit 4 Textabbildungen	234
Winterstein, H., Der Einfluß der Körpertemperatur auf das Säure-Basen-Gleichgewicht im Blut	1
Wöhler, F., s. Keiderling, W., und H. Altmeyer.	
Zorn, B., und A. Mankel, Über die antiarthritische Wirksamkeit einiger Derivate des 2-Phenyl-4-(oxy-acetyl)-chinolins. Mit 6 Textabbildungen .	362

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Istanbul.

Der Einfluß der Körpertemperatur auf das Säure-Basen-Gleichgewicht im Blut.

Von

HANS WINTERSTEIN.

(Eingegangen am 24. März 1954.)

Der Einfluß, den Änderungen der Körpertemperatur auf das Geschehen im Warmblüterorganismus ausüben, ist früher nicht Gegenstand sehr zahlreicher Untersuchungen gewesen. Im wesentlichen haben nur die im Rahmen krankhafter Vorgänge auftretenden fieberhaften Erhöhungen, und die bei winterschlafenden Säugetieren zu beobachtenden Erniedrigungen der Körpertemperatur größeres Interesse gefunden. Wenn im folgenden an der Hand der bisherigen Literatur und eigener Tierversuche unsere bisherigen Kenntnisse über die Wirkung der Temperatur auf die Reaktion des Blutes zusammengestellt werden sollen, so ist es zunächst nötig, einige theoretische Grundlagen des Problems auseinanderzusetzen, die bisher wenig Beachtung gefunden haben.

1. Physikalisch-chemische Grundlagen.

Was wir als chemische Reaktion einer Flüssigkeit bezeichnen, ist gegeben durch das Verhältnis der Konzentrationen (richtiger Aktivitäten) der Wasserstoff- und der Hydroxylionen, also durch den Ausdruck $\frac{[\text{OH}]}{[\text{H}]}$ oder $\frac{c\text{OH}}{c\text{H}}$. (Wir wählen die $c\text{OH}$ als Zähler, weil sie im Organismus fast immer viel größer ist als die $c\text{H}$.) Wenn man wegen des geringen Umfanges der Dissoziation des Wassers die Konzentration des undissoziierten Wassers als konstant betrachtet, dann stellt bekanntlich nach dem Massenwirkungsgesetz das Produkt $[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]$ eine konstante Größe dar, so daß, wenn der eine der beiden Faktoren bekannt ist, der andere aus der Dissoziationskonstante des Wassers ohne weiteres berechnet werden kann. Da die $c\text{H}$ der Messung viel leichter zugänglich ist, so hat man sich gewöhnt, die $c\text{H}$ oder deren negativen Logarithmus p_{H} (Wasserstoffexponent) einfach als Maß der chemischen Reaktion einer Flüssigkeit zu verwenden¹.

Daß der in mancher Hinsicht sehr bequeme Ausdruck p_{H} in vielen Fällen recht unzweckmäßig sein kann, ist schon mehrfach betont worden. Die gegensinnige

¹ Bei dieser Gelegenheit sei darauf hingewiesen, daß, wie ich zufällig vor kurzem entdeckt habe, in den viel verwendeten Tabellen von YLPPÖ, die in sehr bequemer Weise die Ablesung der p_{H} -Werte aus der elektromotorischen Kraft der Meßkette gestatten, die Werte für 38° C infolge Verwendung einer falschen Konstante sämtlich unrichtig berechnet sind. Um die richtigen Werte zu finden, muß man für die beim Blut in Betracht kommenden Spannungen von den in der Tabelle angegebenen p_{H} -Werten je 0,09 abziehen.

Änderung von cH und pH wird immer wieder der Anlaß zu Irrtümern und Verwechslungen, und die logarithmische Verzerrung der Werte gibt oft ein ganz unübersichtliches Bild der beobachteten Veränderungen. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, diesem Übelstande abzuhelpen. Schon vor langer Zeit hat Joos den Vorschlag gemacht, eine cH von 10^{-9} (wohl der niedrigste im Bereich der Biologie mögliche Wert) als Einheit zu nehmen, so daß alle beobachteten cH -Werte als Vielfaches dieser Einheit in positiven Zahlen ausgedrückt würden. Wohl ohne Kenntnis dieses Vorschlages hat neuerdings GRAY dieses Verfahren in seinem Buche angewandt.

Danach entspricht z. B. einem pH von 7 ein „ H^+ “-Wert von $\frac{10^{-7}}{10^{-9}} = 100$; ein pH von 7,35 ($= cH \ 0,447 \cdot 10^{-7}$) entspricht $0,447 \frac{10^{-7}}{10^{-9}} = 44,7$ usw. Bei der allgemeinen Verbreitung, die die Verwendung des pH -Symbols gefunden hat, besteht aber wohl wenig Aussicht, daß diese an sich sehr praktische Darstellungsweise sich einbürgert.

Wir nennen die chemische Reaktion neutral, wenn cH und cOH einander gleich, der obige Quotient also $= 1$ ist, wir nennen sie *sauer*, wenn die cH größer, und *alkalisch*, wenn sie kleiner ist als die cOH . Wenn man die Dissoziationskonstante des Wassers zu 10^{-14} annimmt, entspricht also neutrale Reaktion einem cH 10^{-7} oder pH 7, und die Reaktion ist dann sauer, wenn pH kleiner, alkalisch, wenn er größer ist als 7. Es wird meist gar nicht berücksichtigt, daß alle diese Betrachtungen nur für eine Temperatur von $22^\circ C$ gelten, für eine Temperatur also, die in der menschlichen Physiologie und Pathologie überhaupt nicht in Betracht kommt. Die Dissoziationskonstante des Wassers ändert sich nun außerordentlich stark mit der Temperatur; *daher entspricht für gewöhnlich weder ein pH 7 einer Neutralität, noch kann der pH allein überhaupt als Maß der Reaktion dienen, sofern die Temperatur, bei der eine Untersuchung ausgeführt wird, während derselben wechselt.* Bei der normalen Bluttemperatur von $38^\circ C$ ist bei neutraler Reaktion der pH 6,8, also ein pH , der auch in der stärksten „Acidose“ wohl niemals erreicht wird. Man hat sich so gewöhnt, ein pH 7 als neutral aufzufassen, daß in einem kürzlich erschienenen Buch eines amerikanischen Klinikern allen Ernstes zu lesen ist, reines Wasser wäre bei Körpertemperatur „schwach sauer“.

So ist es vielleicht nicht überflüssig, an einem einfachen Beispiel zu zeigen, wie wenig es angeht, den pH allein als Maß der Reaktion zu verwenden, wenn die Temperatur dabei nicht unverändert bleibt: Wir wählen 3 Flüssigkeiten, die alle den gleichen pH von 7 zeigen sollen, aber die eine bei 22° , die zweite bei 16° und die dritte bei $40^\circ C$. Da die absoluten Werte viel anschaulicher sind als die logarithmischen, seien die Berechnungen in cH und cOH wiedergegeben. Es sei also die cH aller 3 Flüssigkeiten gleich $1 \cdot 10^{-7}$. Dann ist bei 22° $cOH = \frac{1 \cdot 10^{-14}}{1 \cdot 10^{-7}} = 1 \cdot 10^{-7}$, bei $16^\circ = \frac{0,63 \cdot 10^{-14}}{1 \cdot 10^{-7}} = 0,63 \cdot 10^{-7}$ und bei $40^\circ = \frac{3,80 \cdot 10^{-14}}{1 \cdot 10^{-7}} = 3,8 \cdot 10^{-7}$ *.

* Die Dissoziationskonstanten des Wassers entnommen aus MICHAELIS, S. 8.

Das Basen/Säure-Verhältnis $\frac{cOH}{cH}$ ist also bei $22^\circ = \frac{1 \cdot 10^{-7}}{1 \cdot 10^{-7}} = 1$, bei $16^\circ = \frac{0,63 \cdot 10^{-7}}{1 \cdot 10^{-7}} = 0,63$ und bei $40^\circ = \frac{3,8 \cdot 10^{-7}}{1 \cdot 10^{-7}} = 3,8$. Von den drei Flüssigkeiten, die alle die gleiche cH (und natürlich auch pH) aufweisen, ist also die bei 16° sauer, die bei 22° neutral und die bei 40° alkalisch.

Die wichtige Tatsache, daß Analoges auch für die Körperflüssigkeiten gilt, hat in der Literatur auffallend wenig Beachtung gefunden. Selbst in den ausgezeichneten zusammenfassenden Darstellungen des Säure/Basen-Gleichgewichts von GOLLWITZER-MEIER und von PETERS u. VAN SLYKE wird zwar der noch zu erwähnende Einfluß der Temperatur auf den pH -Wert besprochen, die gewaltige Verschiebung des Säure/Basen-Gleichgewichtes durch die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante des Wassers aber mit keinem Wort erwähnt. Und doch hat schon der Begründer der modernen Lehre vom Säure/Basen-Gleichgewicht im Blute, L. HENDERSON, nachdrücklich darauf hingewiesen. Aus seinen am Kohlensäure-Bicarbonat-System ausgeführten Berechnungen schloß er, daß ähnliche Verhältnisse auch beim Blut vorliegen, und daß, obwohl die cH sich wenig ändert, „die Alkalinität des Blutes und des Protoplasmas wesentlich bei steigender Temperatur zunimmt, um fast soviel als die Wasserkonstante selbst“ (siehe S. 300). Am Blut ausgeführte Untersuchungen bestätigten die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung. „Schließlich ist es klar, daß die Zunahme der Alkalinität des Blutes, wenn die Körpertemperatur bis zu hohem Fieber steigt, nicht unbeträchtlich (ungefähr 25%) und wahrscheinlich nicht unbedeutend in ihren Wirkungen sein muß“ (siehe S. 301).

Wir haben also bei Untersuchung des Einflusses der Temperatur zwei wohl voneinander zu sondernde Probleme vor uns, und ehe wir die physiologische Seite der Frage erörtern, müssen wir untersuchen, was für einen Einfluß die *Meßtemperatur* auf die cH (richtiger gesagt auf das Verhältnis $cOH:cH$) ausübt. — Rein empirisch ist MICHAELIS (S. 101/2) an Hand einer großen Zahl von Bestimmungen zu dem Resultat gekommen, daß der Durchschnittswert des pH bei 38° 7,35 ($= cH 0,447 \cdot 10^{-7}$) und bei Zimmertemperatur (18°) 7,56 ($= cH 0,275 \cdot 10^{-7}$) entspricht. Der pH des Blutes nimmt also mit steigender Temperatur deutlich ab. Berücksichtigt man, wie dies üblich ist, nur diesen, so müßte man meinen, daß das Blutsystem saurerer wird. In Wirklichkeit ist, wie wir eben schon gehört haben, das Gegenteil der Fall. Berechnet man außer der cH auch die cOH , so erhält man bei 18° : $cOH = \frac{0,74 \cdot 10^{-14}}{0,275 \cdot 10^{-7}} = 2,69 \cdot 10^{-7}$ und bei 38° : $\frac{3,35 \cdot 10^{-14}}{0,447 \cdot 10^{-7}} = 7,49 \cdot 10^{-7}$. Das Ansteigen der cOH ist also viel beträchtlicher als das der cH . Berechnet man den Quotienten $\frac{cOH}{cH}$, so ergibt sich für 18° die Zahl 9,78, für 38° dagegen 16,76. Diese einfache

Rechnung zeigt, wie falsch es ist, bei Änderungen der Temperatur den p_H als Maß der Reaktion zu verwenden.

Die bloße Änderung der Meßtemperatur bewirkt also *in vitro* eine starke Verschiebung des Säure/Basen-Gleichgewichtes des Blutes.

STADIE u. Mitarb. stellten unter Berücksichtigung des Säure/Basen-Gleichgewichtes der Bluteiweißkörper eine Gleichung für die Änderung des p_H mit der Temperatur bei konstantem CO_2 -Gehalt auf und fanden an Hunde- und Schafserum die berechneten und die experimentell bestimmten Werte in guter Übereinstimmung. Die (colorimetrisch gemessenen) p_H -Werte waren bei 20° um 0,2—0,3 höher als bei 38° , was mit den obigen MICHAELISSchen Werten für Menschenblut ungefähr übereinstimmt. Ähnliches gilt auch für neuere Autoren. ROSENTHAL und WILSON stimmen darin überein, daß die Temperaturabhängigkeit des p_H linear ist und daß daher, wenn die Messung bei beliebiger Temperatur vorgenommen wird, sein Wert für eine andere Temperatur durch Extrapolation berechnet werden kann. Nach ROSENTHAL ist $p_H^{38^\circ} = p_H^t - 0,0147 (38 - t)$. WILSON findet als Mittelwert beim Menschen bei 4° einen p_H 7,85 und bei 40° 7,36. Die Resultate stimmen also nicht genau überein; die Differenz beträgt pro 1° bei ROSENTHAL 0,0147, bei WILSON 0,0136, bei MICHAELIS 0,0105.

Wenn man, wie dies vielfach geschieht, die Meßtemperatur nicht berücksichtigt, kann man also zu ganz irrigen Schlußfolgerungen gelangen. Will man die bei einer bestimmten Körpertemperatur im Organismus herrschenden Gleichgewichtsverhältnisse erforschen, so muß auch die Messung bei der ihr entsprechenden Temperatur vorgenommen werden.

2. Literaturübersicht über Hyperthermie.

Die Wirkung der Hyperthermie auf das Säure/Basen-Gleichgewicht scheint zuerst HAGGARD untersucht zu haben. Er fand — entgegen seinen Erwartungen — in Bädern von 43° eine Zunahme des Atemvolumens und infolgedessen eine Abnahme der gelösten Kohlensäure ohne entsprechende Abnahme der gebundenen, so daß die — direkt nicht untersuchte — cH eine Herabsetzung erfahren mußte. CAJORI u. Mitarb. beobachteten an der in einem elektrischen Heizkasten befindlichen Vp. gleichfalls eine offenbar durch die Hyperpnoe bedingte Abnahme des CO_2 -Gehaltes des venösen Blutes und eine teils berechnete, teils direkt colorimetrisch bestimmte Zunahme des p_H (Körpertemperatur nicht angegeben) zwischen 0,03 und 0,26, in einem Falle allerdings eine Abnahme. Analog sind die von FLINN u. SCOTT in der Wärmekammer an Hunden gewonnenen Ergebnisse. Solange der CO_2 -Gehalt des Blutes keine Änderung zeigte, blieb auch der (colorimetrisch gemessene) p_H unverändert. Bei sehr hoher Außentemperatur aber (zwischen 45 und 50°) stieg mit dem durch die starke Hyperpnoe bedingten Abfall der Kohlensäure auch der p_H (von 7,57 bis auf 7,83). Übereinstimmend sind auch die Resultate von ADOLPH (1) am Menschen bei Aufenthalt in dampfgesättigtem Raum von $40^\circ C$, nämlich Absinken des CO_2 -Gehaltes und der cH. BAZETT u. seine Mitarb. (LANDIS usw.) haben am Menschen die Wirkung heißer Bäder ($40,2$ — 43°) untersucht, die zu einer Erhöhung der Muskeltemperatur bis auf $39,2$ — $40,3^\circ$ führte. Es war ein gewaltiger Anstieg der Atmung, zuerst der Atmungstiefe, dann auch der Frequenz, und ein Absinken der aus der Expirationsluft berechneten alveolaren CO_2 -Spannung sowie jener des Armvenenblutes zu beobachten. Die dadurch erzeugte p_H -Steigerung von 0,12 — 0,33 konnte so groß sein, daß es zur Entwicklung eines Zustandes von Tetanie kam. In 2 Versuchen waren die dabei auftretenden Krämpfe so stark, daß die durch sie erzeugte Milchsäureausschüttung wieder zu einer p_H -Senkung führte.

Die Wirkung des *Fiebers* auf den Säure/Basen-Haushalt ist von KOEHLER genauer untersucht worden. Er bestritt die Richtigkeit der auf die bloße Untersuchung der CO_2 -Bindungskurve gestützten Ansicht, daß das Fieber mit einer Acidose einhergehe. In allen von dem Verfasser untersuchten Fieberanfällen zeigte sich eine ausgesprochene unkompenzierte *Alkalose* mit einem pH bis zu 7,6. Dagegen würde selbst bei einer kurzdauernden Hungerperiode eine deutliche Neigung zu pH -Senkung bestehen, so daß der im Fieber meist bestehende Hungerzustand vielleicht eine Abwehrmaßnahme des Organismus gegen die Störung des Säure/Basen-Gleichgewichtes darstelle. Analog dem Fieber fand der Verf. auch die Wirkung heißer Bäder. Auch hier sank der CO_2 -Gehalt und stieg der pH . Alle diese alkalotischen Zustände sind wahrscheinlich einfach eine Folge der Hyperpnoe.

Die von KROETZ unter dem Einfluß von Wärmestrahlen am Menschen beobachtete pH -Steigerung war nicht mit einer Erhöhung der Körpertemperatur verbunden, also auch nicht durch eine solche direkt bedingt. Beim Wärmestich will AKIYA zuerst eine Erhöhung und nachher eine Herabsetzung des pH beobachtet haben. Nach ihm wäre jedes Fieber während des Temperaturanstieges von einer alkalotischen Stoffwechsellaage begleitet, die auf der Höhe des Fiebers in eine Acidose übergehe, um beim Fieberabfall wieder einer Alkalose Platz zu machen.

In allen bisher erwähnten Arbeiten wurde der pH , soweit er überhaupt direkt bestimmt wurde, im Serum mit nicht sehr genauen colorimetrischen Methoden untersucht. BANUS hat sich einer (seiner Angabe nach bis auf 0,01 pH genauen) Wasserstoffelektrode bedient, aber nicht die aktuelle, sondern die auf verschiedenen CO_2 -Druck reduzierte Blutreaktion gemessen. Seine Versuche wurden an Hunden ausgeführt, die in einem Bade von maximal 42°C im Verlaufe von $1\frac{1}{2}$ — $1\frac{3}{4}$ Std eine Körpertemperatur von 40 — 41° erreichten, die bis zu 8 Std aufrecht erhalten wurde. Die Blutproben wurden *vor* dem Eintauchen und nach 2 und nach 6 Std entnommen. Alle Bestimmungen erfolgten bei 25°C . Sie führten zu dem Ergebnis, daß das Blut in der Hyperthermie bei niedrigem CO_2 -Druck (15 mm) einen verringerten, bei hohem CO_2 -Druck (45 mm) einen unveränderten oder alkalischeren pH zeigte als in der Norm. Der Verf. glaubt aus seinen Resultaten den Schluß ziehen zu müssen, daß in der Wärme das Hämoglobin zwecks leichterer Alkaliabgabe in eine Form von geringerer O_2 -Kapazität verwandelt würde, was sich ja ohne weiteres aus der BARCROFTSchen Temperaturkurve ergibt. Auf die Wichtigkeit, alle Messungen bei der Versuchstemperatur vorzunehmen, haben wir schon hingewiesen.

BISCHOFF u. Mitarb., die freilich wieder mit der für Blut ungeeigneten Chinhydronelektrode arbeiteten und die bei Zimmertemperatur erhaltenen Werte für die betreffende Körpertemperatur umrechneten, untersuchten am Menschen die Wirkung der durch Hochfrequenzströme und durch Kurzwellenbehandlung erzeugten Temperaturerhöhung auf etwa 39° . Sie fanden keinen Unterschied gegenüber der auf andere Weise bewirkten Hyperthermie. Im Vordergrund stand der CO_2 -Verlust und die damit verbundene pH -Steigerung, die Werte von mehr als 0,2 erreichen konnte. Es erscheint wohl zweifellos, daß sie durch die bei der Hochfrequenzbestrahlung in jedem Fall festgestellte, in der zweiten Versuchsreihe nicht untersuchte, Hyperpnoe bedingt war. — GORDON u. Mitarb. untersuchten die Wirkung von Fiebertherapie an Kranken, deren Körpertemperatur in einer feuchten Heißluftkammer im Verlaufe von 80—120 min auf 40 — 41° gesteigert wurde, und die dann 3—4 Std bei dieser Temperatur belassen wurden. Seltsamerweise beobachteten sie eine Hyperthermie mit konsekutiver Senkung der arteriellen CO_2 -Spannung und (berechneten) pH -Steigerung (im Mittel um 0,07) nur bei Personen, die kein Beruhigungsmittel erhalten hatten, während die Kranken, denen vorher Luminal mit Morphin oder dergleichen verabreicht worden war, keine deutliche Abweichungen von der Norm zeigten.

3. Literaturübersicht über Hypothermie.

Die Wirkungen der Hypothermie haben vor allem seit dem letzten Weltkrieg Interesse erweckt, seit ungenügend ausgerüstete Soldaten und in großen Höhen fliegende oder ins Wasser gestürzte Flieger großen Kälte-traumen ausgesetzt waren, und in neuester Zeit, seit Abkühlung im sogenannten „künstlichen Winterschlaf“ in die chirurgische Technik Eingang gefunden hat.

Aus älterer Zeit liegen Versuche von LODE u. BURTSCHER vor, die in Versuchen an Kaninchen bei Abkühlung ausnahmslos ein Absinken der Alkalireserve und (mit einer von den Autoren selbst als nicht sehr genau bezeichneten Methode) in der Mehrzahl der Fälle ein Absinken des p_H beobachteten. Gleichzeitig stieg die Frequenz der kräftig bleibenden Atmung, die erst nahe der Grenze des Lebens bei 26° abzuflachen begann. Auch STAEMMLER fand in Versuchen an Kaninchen, Meer-schweinchen und Ratten bei schneller Abkühlung ein Absinken der Alkalireserve, verbunden mit einer Zunahme der Milchsäure im Blut. In neuerer Zeit haben DILL u. FORBES am Menschen Versuche angestellt. Die Abkühlung (bis zu 25°!) erfolgte durch eine bis zu 45 Std dauernde Umspülung der die Vp. umgebenden Gummihülle mit Flüssigkeiten von einigen Grad Kälte. Entgegen den theoretischen Erwartungen der Autoren ergab sich nicht eine Erhöhung, sondern eine beträchtliche Verminderung der Alkalireserve um meist ein Viertel, in einem Falle sogar um die Hälfte. Es war meist eine Hyperpnoe vorhanden und der (berechnete) p_H zeigte meist eine leichte, im Mittel aber nur 0,02 betragende Verschiebung nach der saueren Seite. Die von den Autoren wiedergegebenen Werte zeigen jedoch derartige Schwankungen, daß aus solchen Daten wohl weder ein Mittelwert noch eine Schlußfolgerung gezogen werden kann (in einem Falle z. B. war der p_H bei 37° gleich 7,39, sank bei einer Abkühlung auf nur 36,3° auf 7,26, also um 0,13 (!), um nachher trotz Erhöhung der Körpertemperatur auf 38,5° noch auf 7,21 weiterzufallen).

Das gleiche gilt auch für die Untersuchungen von GROSSE-BROCKHOFF u. SCHOEDEL und von v. WERZ. Die ersteren beobachteten in 3 von 4 Hundeversuchen eine Herabsetzung der Alkalireserve, die nicht durch Steigerung der Milchsäurebildung erklärbar war. v. WERZ bestimmte in Abkühlungsversuchen an Katzen in einigen Fällen auch den p_H mit einer wohl schwerlich zuverlässigen niederohmigen Glaselektrode und beobachtete Verminderungen desselben.

Im physiologischen Institut der Bostoner Universität wurden von HEGNAUER u. seinen Mitarb. in den Jahren 1948—53 zahlreiche (im American Journal of Physiology veröffentlichte) Untersuchungen an in Eiswasser abgekühlten Hunden ausgeführt. WATERIUS u. MAISON konnten dabei 13 Hunde auf eine Rectaltemperatur von im Mittel 14,9° (11,7!—16,8) abkühlen und durch rasche Wiedererwärmung in Wasser von 42—45°, wenn nötig unter Zuhilfenahme von künstlicher Atmung am Leben erhalten. Die Blutgase solcher Tiere wurden von ROSENHAIN u. PENROD untersucht und in einigen Fällen auch der p_H , aber nicht direkt, sondern an Blut, das mit dem im Versuch beobachteten CO_2 - und O_2 -Gehalt gesättigt war. Es ergab sich kein bemerkenswerter Unterschied. Die Verf. weisen darauf hin, daß infolge der erhöhten CO_2 -Löslichkeit in der Kälte das Blut bei unverändertem CO_2 -Druck und p_H viel mehr Kohlensäure enthalten wird, berücksichtigen aber nicht, daß infolge der Änderung der Wasser-Dissoziationskonstante ein Gleichbleiben des p_H einer Reaktionsverschiebung nach der saueren Seite entspricht.

BEHNKE u. YAGLOU haben bei 2 nackt im Eiswasser und einem in Winterkleidung in einer Kältekammer von -29° C abgekühlten Menschen bei einer Mastdarmtemperatur von etwa 35° gewaltige Steigerungen des Atemvolumens beobachtet. Es handelt sich hier offenbar um eine Folge des durch das Frieren erzeugten

starken Muskelzitterns. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß ADOLPH (2) an Katzen und Hamstern ein Ansteigen der letalen Abkühlungstemperatur mit dem Alter beobachtete und feststellte, daß die Atmung in den ersten 10—15 Tagen nach der Geburt bei Abkühlung abnimmt, dann aber eine deutliche Beschleunigung erfährt, offenbar sobald die Tiere die Fähigkeit erworben haben, auf Abkühlung mit einer gesteigerten Wärmeproduktion zu reagieren.

Die für uns wichtigsten Untersuchungen (von denen wir erst nach Beendigung des größten Teiles unserer eigenen Versuche Kenntnis erhielten) sind kürzlich von OSBORN mitgeteilt worden, der sich speziell das Studium der bei der Hypothermie auftretenden Änderung der Atmung und des Blut- p_H zur Aufgabe gestellt hat. Der p_H wurde mit Glaselektrode kontinuierlich im strömenden Blute gemessen, also offenbar bei der jeweiligen Versuchstemperatur. Hunde wurden im Wasserbad von 9—10° abgekühlt, bis die Rectaltemperatur auf einige 20° gesunken war. Bei leichter Nembutalnarkose trat Kältezittern auf mit einer anfänglichen Zunahme des Minutenatemvolumens, das zu einem Ansteigen des p_H bis auf 7,6 führen konnte. Sobald die Temperatur auf etwa 31° C abgesunken war, begannen Atemvolumen und p_H zu fallen, bis bei etwa 24° Atemstillstand eintrat; der p_H war in der Zwischenzeit bis auf 7,1—7,2 gesunken. Bei tiefer Narkose kam das Kältezittern und damit auch die anfängliche Atemsteigerung und p_H -Erhöhung in Fortfall. — In einer zweiten Versuchsserie wurde künstliche Atmung durchgeführt. Trotzdem trat zu Beginn eine leichte p_H -Steigerung ein. Von 30° ab begann unvermeidlich eine Acidose. Der (mit einer colorimetrischen Methode geschätzte) CO_2 -Gehalt der Ausatemungsluft ergab unterhalb 27° einen steilen Abfall von 5—6% auf oder (bei 24°) unter 1%. Er fiel zusammen mit einem raschen Absinken des p_H und Ansteigen des arteriellen CO_2 -Druckes, so daß eine plötzliche teilweise Blockade der CO_2 -Ausscheidung eingetreten sein mußte, trotz regelmäßiger Weiterführung der künstlichen Atmung. — In weiteren Versuchen wurde diese so gehalten, daß der Blut- p_H konstant blieb. Dadurch gelang es nicht nur die anfängliche Alkalose, sondern bei gewaltiger Steigerung des Atemvolumens (mitunter bis auf das 3fache) auch die Acidose zu verhüten. — Wurden bis auf 20° abgekühlte Tiere im Wasserbad von 40° C wieder erwärmt, so zeigte sich das Spiegelbild der bei Abkühlung beobachteten Veränderungen. Die Acidose verschwand bei 25°, aber der CO_2 -Gehalt der Expirationsluft blieb zunächst niedrig und begann gewöhnlich bei etwa 26° Rectaltemperatur plötzlich zu steigen mit gleichzeitigem Ansteigen des arteriellen p_H . Bei 28° kehrte Kältezittern und spontane Atmung zurück. — Hinsichtlich des Überlebens waren 2 Gruppen in statistisch gesicherter Weise zu unterscheiden: Nur die Hunde, bei denen in der vorhin erwähnten Weise der p_H konstant gehalten und sowohl Alkalose wie Acidose verhindert worden waren, konnten überleben. Hierbei schien die Verhinderung der anfänglichen Alkalose wichtiger als die der Acidose. Auch das Auftreten von Herzflimmern war in deutlichem Zusammenhange mit dem während der anfänglichen Alkalose verbundenen Absinken des Bicarbonats. Angesichts der Bedeutung dieses letzten Faktors wurde bei 6 Hunden der Bicarbonatgehalt vor der Abkühlung dadurch gesteigert, daß bei der künstlichen Atmung Luft mit erhöhtem CO_2 -Gehalt verwendet wurde, was kompensatorisch auch zu einer Erhöhung des Bicarbonatgehaltes führte. Unter diesen Bedingungen überlebten (als einzige) 2 von den 6 Hunden, die nach Abkühlung bis auf 19° vorgenommene Erwärmung *dauerte*. Alle anderen Hunde, auch wenn sie die Wiedererwärmung überlebt hatten, gingen nachträglich an sekundären Folgen zugrunde. Die Schädlichkeit der anfänglichen Alkalose würde auf dem kompensatorischen Bicarbonatverlust beruhen, der den Organismus gegen die nachfolgende Acidose empfindlicher mache.

Den Versuch einer Deutung dieser bemerkenswerten Ergebnisse siehe unten S. 16.

4. Experimenteller Teil.

Methodik. Als Versuchstiere dienten 12 Kaninchen, 2 Katzen und 2 Hunde. Der p_H der aus der Carotis entnommenen Blutproben wurden jeweils bei der Körpertemperatur, bei der die Entnahme erfolgte, unter Zusatz von ein wenig Liquemin Roche, in einer MARCONISCHEN Glaselektrodenapparatur bestimmt, und daraus entsprechend den in der Einleitung gegebenen Darlegungen der absolute Wert der Wasserstoff- und der Hydroxylionen-Konzentrationen, sowie der sich daraus ergebende Basen/Säure-Quotient $\frac{cOH}{cH}$ berechnet. Die Volumschwankungen der At-

mung wurden mittels einer in die Luftröhre eingebundenen Kanüle, die zu einer mit etwas KOH versetzten Vorlageflasche führte, jedesmal für kurze Zeit auf dem berußten Papier eines Kymographion aufgeschrieben. Die entsprechenden absoluten Volumwerte wurden durch Eichung geschätzt und das Minutenvolumen als Produkt von Frequenz und Tiefe berechnet; die so erhaltenen Werte sind nur für Vergleiche zuverlässig. In den beiden Hundeversuchen wurde zur Messung des Minutenvolumens der Atmung die Trachealkanüle mittels eines Ventils direkt mit einer Gasuhr in Verbindung gesetzt. Mit Ausnahme eines mit Nembutal narkotisierten Hundes wurden alle übrigen Versuchstiere mit Urethan (meist 2 g pro kg) tief narkotisiert.

Die *Erwärmung* wurde bei den Kaninchen durch Bäder von einigen 40°, in den beiden Hundeversuchen durch intravenöse Injektion von Methylenblau erzielt, das nach der Entdeckung von HEYMANS bei Hunden durch Stoffwechselsteigerung relativ schnell eine gewaltige Temperaturerhöhung herbeizuführen vermag. Die *Abkühlung* wurde im allgemeinen durch Kältebäder bewirkt. Nur im Kaninchenversuch 12 und in den beiden Katzenversuchen 13 und 14 wurden die Tiere bei Zimmertemperatur liegen gelassen. Das Kaninchen erhielt dabei in unregelmäßigen Intervallen je 2, insgesamt 16 mg des Ganglionplegicums Pendiomid¹, und die Katze in Versuch 14, gleichfalls in unregelmäßigen Abständen je 5 mg (einmal 7), im ganzen 47 mg des Ganglionplegicums Largactil². Nachdem ihre Temperatur auf 32,5° abgesunken war, erhielt sie in einem Abstand von 30 min 2 Dosen von je 150 mg Methylenblau, um zu sehen, ob vielleicht wieder ein Temperaturanstieg erfolgen würde; dies war jedoch nicht der Fall. Auch bei der Katze Nr. 13 vermochte Methylenblau, in Dosen von 2,5–10 mg (insgesamt 120 mg) die allmähliche Abkühlung an der Luft nicht zu verhindern. Ob die verabreichten Ganglionplegica in der angewandten Dosis eine Beschleunigung der Abkühlung bewirkten, erscheint zweifelhaft³.

Über die erhaltenen *Ergebnisse* unterrichten die folgenden Tabellen.

Aus den Tabellen ergibt sich, daß bei einer *Hyperthermie* durch Wärmezuleitung von außen in 4 von 6 Kaninchenversuchen (Nr. 7, 8, 9, 11) eine Verschiebung der Blutreaktion nach der *alkalischen* Seite eintrat, in einem Versuche nach der *saueren* (Nr. 6) während in einem schließlich (Nr. 5) keine deutliche Reaktionsänderung feststellbar war. Das letztere gilt auch für die beiden Hunde, bei denen die Temperatursteigerung von innen her, durch Erhöhung der Wärmebildung mittels Methylenblauinjektion herbeigeführt worden war. In allen Versuchen

¹ Chemisch: N,N,N',N'-3-Pentamethyl-N,N'-diäthyl-3-azo-pentan-1,5-diammonium-dibromid.

² Chemisch: 10(3'-Dimethylamino-propyl)-3-Chlor-Phenothiazin-Chlorhydrat.

³ Für Mithilfe bei einem Teil der Versuche bin ich Frau Dr. GÖKHAN zu Danke verpflichtet.

1. Hyperthermieversuche.

a) Kaninchen.

Nr.	t°	pH	cH · 10 ⁻⁷	cOH · 10 ⁻⁷	$\frac{cOH}{cH}$	Atmung	
						Frequenz	min Vol cm³
5	37,5	7,36	0,44	$\frac{3,24}{0,44} = 7,41$	16,84	84	105
	40	7,33	0,47	$\frac{3,80}{0,47} = 8,08$	17,19	132	1452
	42	7,28	0,53	$\frac{4,26}{0,53} = 8,04$	15,71	108	1512
6	36	7,43	0,37	$\frac{2,92}{0,37} = 7,89$	21,32	90	810
	40	7,30	0,50	$\frac{3,80}{0,50} = 7,60$	15,20	162	1620
7	37	7,39	0,41	$\frac{3,13}{0,41} = 7,63$	18,61	78	702
				(erst Abkühlungsversuch)			
	30,5	7,32	0,48	$\frac{1,965}{0,48} = 4,09$	8,52	36	432
	37	7,37	0,43	$\frac{3,13}{0,43} = 7,28$	16,93	114	969
8	39	7,37	0,43	$\frac{3,59}{0,43} = 8,35$	19,42	132	1518
	36	7,37	0,43	$\frac{2,92}{0,43} = 6,79$	15,97	60	480
	39,5	7,39	0,41	$\frac{3,70}{0,41} = 9,02$	22,00	156	936
9	38	7,43	0,37	$\frac{3,35}{0,37} = 9,05$	24,46	60	390
	40	7,44	0,36	$\frac{3,80}{0,36} = 10,56$	29,33	192	960
	42	7,45	0,35	$\frac{4,25}{0,35} = 12,14$	34,68	216	1134
11	36	7,30	0,50	$\frac{2,92}{0,50} = 5,84$	12,67	60	480
	40	7,36	0,44	$\frac{3,80}{0,44} = 8,64$	19,64	132	1122
				(2 $\frac{1}{2}$ Std auf 40° gehalten)			
	40	7,36	0,44	$\frac{3,80}{0,44} = 8,64$	19,64	132	1188
	36	7,11	0,78	$\frac{2,92}{0,78} = 3,74$	4,79	66	297

1. Hyperthermieversuche.

(Fortsetzung.)

b) Hunde.

Nr.	t°	pH	cH · 10 ⁻⁷	cOH · 10 ⁻⁷	$\frac{cOH}{cH}$	Atmung	
						Frequenz	min Vol cm ³
15	38	7,28	0,53	$\frac{3,35}{0,53} = 6,32$	11,92		2250
	43	7,22	0,60	$\frac{4,52}{0,60} = 7,53$	12,55		7910
16	38	7,28	0,53	$\frac{3,35}{0,53} = 6,32$	11,92		etwa 6000
	41	7,23	0,59	$\frac{4,01}{0,59} = 6,80$	11,25	etwa 200	20—30000

2. Hypothermieversuche.

Nr.	t°	pH	cH · 10 ⁻⁷	cOH · 10 ⁻⁷	$\frac{cOH}{cH}$	Atmung	
						Frequenz	min Vol cm ³
1	37	7,33	0,47	$\frac{3,13}{0,47} = 6,66$	14,17		
	31	7,33	0,47	$\frac{2,04}{0,47} = 4,34$	9,23		
2	36,5	7,42	0,38	$\frac{3,03}{0,38} = 7,97$	20,97		
	30	7,44	0,36	$\frac{1,89}{0,36} = 5,25$	14,58		
3	27	7,37	0,43	$\frac{1,50}{0,43} = 3,49$	8,16		
	37	7,39	0,41	$\frac{3,13}{0,41} = 7,63$	18,61		
4	32	7,31	0,49	$\frac{2,19}{0,49} = 4,47$	9,12		
	28	7,28	0,53	$\frac{1,62}{0,53} = 3,06$	5,77		
	37	7,33	0,47	$\frac{3,13}{0,47} = 6,66$	14,17	60	420
	32	7,25	0,56	$\frac{2,19}{0,56} = 3,91$	7,00	21	147
	26	7,20	0,63	$\frac{1,58}{0,63} = 2,23$	3,54	18	126

2. Hypothermieversuche.

(Fortsetzung.)

Nr.	t°	pH	cH · 10 ⁻⁷	cOH · 10 ⁻⁷	$\frac{cOH}{cH}$	Atmung	
						Frequenz	min Vol cm ³
7	37	7,39	0,41	$\frac{3,13}{0,41} = 7,63$	18,61	78	702
	30,5	7,32	0,48	$\frac{1,965}{0,48} = 4,09$	8,52	36	432
	37	7,37	0,43	$\frac{3,13}{0,43} = 7,28$	16,93	114	969
8	36	7,37	0,43	$\frac{2,92}{0,43} = 6,79$	15,79	60	480
	39,5	7,39	0,41	$\frac{3,70}{0,41} = 9,02$	22,00	156	936
	36	7,43	0,37	$\frac{2,92}{0,37} = 7,89$	21,32	120	1320
	28	7,34	0,46	$\frac{1,62}{0,46} = 3,52$	7,65	48	340
9	38	7,43	0,37	$\frac{3,35}{0,37} = 9,05$	24,46	60	390
				(erst Erwärmungsversuch)			
	42	7,45	0,35	$\frac{4,25}{0,35} = 12,14$	34,68	216	1134
	38	7,35	0,45	$\frac{3,35}{0,45} = 7,44$	16,53	48	288
	33	7,30	0,50	$\frac{2,35}{0,50} = 4,70$	9,40	54	432
10	28	7,31	0,49	$\frac{1,62}{0,49} = 3,31$	6,76	30	173
	38	7,46	0,35	$\frac{3,35}{0,35} = 9,57$	27,34		
	35	7,41	0,39	$\frac{2,71}{0,39} = 6,95$	17,82		
	30	7,40	0,40	$\frac{1,89}{0,40} = 4,73$	11,83		
				2½ Std auf 30° gehalten			
	30	7,40	0,40	$\frac{1,89}{0,40} = 4,73$	11,83	33	330
				in 2 Std erwärmt			
	37	7,46	0,35	$\frac{3,13}{0,35} = 8,91$	25,46	78	702

2. Hypothermieversuche.

(Fortsetzung.)

Nr.	t°	pH	cH · 10 ⁻⁷	cOH · 10 ⁻⁷	$\frac{cOH}{cH}$	Atmung	
						Frequenz	min Vol cm ³
12	36	7,53	0,29	$\frac{2,92}{0,29} = 10,07$	34,72	72	540
				2 ¹ / ₂ Std später			
	32	7,51	0,31	$\frac{2,19}{0,31} = 7,06$	22,77	66	429
				1 ¹ / ₂ Std später			
	30	7,46	0,35	$\frac{1,89}{0,35} = 5,40$	15,43	48	264
13	36	7,35	0,45	$\frac{2,92}{0,45} = 6,49$	14,42	36	468
				nach 100 min			
	33	7,40	0,40	$\frac{2,35}{0,40} = 5,88$	14,70	36	576
				nach 135 min			
	32	7,26	0,55	$\frac{2,19}{0,55} = 3,98$	7,24	108	1296
14	35	7,15	0,72	$\frac{2,71}{0,72} = 3,82$	5,22	24	420
				nach 190 min			
	32,5	7,25	0,56	$\frac{2,27}{0,56} = 4,05$	7,23	21	473
				nach 135 min			
	32	7,12	0,76	$\frac{2,19}{0,76} = 2,88$	3,79	15	315

war eine Erhöhung der Atemfrequenz und daher auch des Minutenvolumens (bei wenig geänderter, oft sogar verminderter Atemtiefe) zu beobachten, in ganz besonders hohem Maße im Versuch Nr. 16.

Künstliche *Hypothermie* ergab in allen 11 Versuchen *ausnahmslos* eine starke Verschiebung des Säure/Basen-Gleichgewichtes $\frac{cOH}{cH}$ nach der *sauer*en Seite. Dies war sowohl in den 8 Kaninchenversuchen (1—4, 7—10) der Fall, bei denen die Hypothermie durch Wärmeentziehung im Wasserbad herbeigeführt wurde, wie bei einem Kaninchen (Nr. 12) und 2 Katzen (13, 14), bei denen die Abkühlung langsam bei Zimmertemperatur erfolgte. In dem Katzenversuch Nr. 13 war in der Absicht, eine *Erhöhung* der Körpertemperatur herbeizuführen, Methylenblau injiziert worden, das sich bei den Hunden erfolgreich bewährt hatte. Es trat keine Temperatursteigerung ein, sondern höchstens vielleicht ein langsamerer Abfall, wie auch in Versuch 14, in welchem das Methylenblau nachträglich verabreicht worden war. Daß Katzen für Methylenblau-

versuche wenig geeignet sind, hatte bereits HEYMANS angegeben. Atmungsfrequenz und -minutenvolumen waren bei Hypothermie stets herabgesetzt.

Im Hypothermieversuch Nr. 7 ergab die Wiedererwärmung auch eine ungefähre Rückkehr des normalen Säure/Basen-Quotienten; in Versuch Nr. 10 war dies so gut wie vollständig der Fall. Hingegen ergab die in Versuch Nr. 8 erfolgte Abkühlung eines vorher auf $39,5^{\circ}$ erwärmten Tieres ein abnormes Verhalten der Reaktion, jedenfalls in Zusammenhang damit, daß bei 36° aus unbekannten Gründen eine starke Hyperpnoe eintrat. Auch in Versuch Nr. 9 ergab die nach vorangehender Erwärmung auf 42° erfolgte Abkühlung auf die Ausgangstemperatur keine völlige Rückkehr der Atmungs- und Reaktionsverhältnisse. Dagegen zeigte der Erwärmungsversuch Nr. 11, in welchem das Tier durch $2\frac{1}{2}$ Std auf 40° gehalten wurde, während dieser Zeit eine völlige Konstanz von Reaktion und Atmung. Das gleiche gilt für den Abkühlungsversuch Nr. 10, bei dem das Tier durch $2\frac{1}{2}$ Std bei einer Körpertemperatur von 30° gehalten worden war.

Erörterung der Temperaturwirkungen.

Versuchen wir auf Grund des bisher vorliegenden alten und neuen Versuchsmaterials uns eine Vorstellung von der Genese und der biologischen Bedeutung der bei Änderungen der Körpertemperatur zu beobachtenden Beeinflussung der Blutreaktion zu machen, so begegnen wir bezüglich der *Hyperthermie* wohl keinen großen Schwierigkeiten. Bei Erhöhung der Körpertemperatur wirken 2 Faktoren in einander entgegengesetzter Richtung: Die mit ihr einhergehende Steigerung des Stoffwechsels muß zu einer vermehrten Bildung von Kohlensäure und wohl auch anderer Säuren führen, die an sich zu einer Verschiebung der Reaktion nach der saueren Seite Anlaß geben müßte. Eine solche ist für den Wärmestich und für den Anstieg des Fiebers von AKIYA beschrieben und auch in einem unserer Kaninchenversuche beobachtet worden. Für gewöhnlich aber wird sie bei weitem überwogen durch die Verschiebung der Blutreaktion nach der *alkalischen* Seite, die eine Folge der thermoregulatorischen Hyperpnoe ist. Es ist seit langem bekannt, daß die Wärme sowohl reflektorisch von der Haut aus, wie vor allem durch direkte Einwirkung auf das Wärmezentrum des Gehirns eine Atmungsbeschleunigung auslöst (Literaturzusammenstellung u. a. bei BAYER und CORDIER u. HEYMANS), wie sie in ihrer krassesten Form als thermische Polypnoe beim „Hecheln“ des Hundes zur Beobachtung kommt. Hier ist es auch, wo die thermoregulatorische Bedeutung der Polypnoe am überzeugendsten nachweisbar ist, da eine Behinderung des „Schwitzens“ über die Zunge“ durch Tracheotomie, ja schon durch einen Maulkorb, die Temperaturregulierung in der Wärme schwer gefährdet. Auch bei

den anderen Säugetieren steht die Beschleunigung des die Lungen passierenden Luftstroms, die, wie auch in unseren Versuchen ersichtlich ist, durch Erhöhung der Frequenz (oft sogar unter Herabsetzung der Atemtiefe) erfolgt, zweifellos mit im Dienste der Wärmeregulation und sorgt gleichzeitig für die erforderliche Verstärkung der Sauerstoffzufuhr und Kohlensäureabgabe. In den beiden Hundeversuchen war offenbar die mit der Stoffwechselsteigerung verbundene Säurebildung so groß, daß sie auch den ungeheueren CO_2 -Verlust, der mit der gewaltigen Atmungssteigerung verbunden sein mußte, gerade zu kompensieren vermochte, und der Säure/Basen-Quotient daher keine nennenswerte Änderung erfuhr. Ähnliches scheint auch bei den Kranken von GORDON u. Mitarb. der Fall gewesen zu sein, sofern die psychisch bedingte Steigerung der Lungendurchlüftung durch Verabreichung von Beruhigungsmitteln ausgeschaltet wurde. — Andererseits kann, wie dies LANDIS u. Mitarb. in einigen Fällen beobachtet haben, die durch die Hyperpnoe erzeugte Alkalose einen solchen Grad erreichen, daß sie Tetanie-Krämpfe auslöst, die — offenbar durch Milchsäureausschüttung — die Blutreaktion nun kompensatorisch nach der *saueren* Seite umschlagen läßt.

Nicht so einfach sind die in der *Hypothermie* zu beobachtenden Verschiebungen des Säure/Basen-Gleichgewichtes zu verstehen. Hier möge zunächst noch einmal auf unsere physikalisch-chemischen Vorbemerkungen hingewiesen werden. Der gewaltige Einfluß, den die Änderung der Wasserkonstante auf dieses Gleichgewicht ausübt, ist von keinem einzigen der früheren Autoren berücksichtigt worden. Bei der Hyperthermie, wo nur eine Temperaturdifferenz von wenigen Graden in Betracht kommt, spielt dies keine große Rolle, anders aber bei den Hypothermien, bei denen nicht selten Differenzen von $10\text{--}20^\circ$ vorliegen. Ein unveränderter p_H bei Abkühlung bedeutet eine deutliche Acidose (im Sinne von Hyperhydrie). Einem p_H von 7,35 entspricht bei 37° ein Quotient $\frac{c_{\text{OH}}}{c_{\text{H}}}$ von 15,7, bei 25° dagegen einem solchen von 6,3, d. h. das Übergewicht der c_{OH} über die c_{H} ist auf weit weniger als die Hälfte abgesunken.

Bei der Deutung der durch die Kälte erzeugten Erscheinungen muß man, wie wir schon beim Studium des Zuckerstoffwechsels nachdrücklich hervorgehoben haben (ERÖZ u. Mitarb.) zwei, zwar ineinander übergehende, aber doch wohl voneinander zu sondernde Perioden auseinanderhalten: die erste, thermoregulatorische, in der der Körper seine Temperatur durch entsprechende Maßnahmen aufrecht zu erhalten versucht, und die zweite, in der diese Fähigkeit verlorengegangen ist, und die direkte Kälte Wirkung zutage tritt. Die erste Periode wird von dem der Steigerung der Wärmebildung dienenden Kältezittern beherrscht. Sie geht mit einer der erforderlichen Verstärkung der Sauerstoffzufuhr dienenden,

reflektorisch ausgelösten *Hyperpnoe* einher, die durch vermehrte Kohlen-säureabgabe die Blutreaktion relativ nach der *alkalischen* Seite verschoben kann. In der eingangs zusammengestellten Literatur haben wir bei Mensch und Tier mehrfach eine solche *Hyperpnoe* erwähnt, und in den Versuchen von OSBORN ist die ihr entsprechende alkalotische Periode deutlich abgesondert. Hierbei ist freilich wieder zu betonen, daß der Ausdruck „alkalotische Periode“ nur im Verhältnis zur nachfolgenden berechtigt ist, da absolut genommen, der vom Autor beobachtete pH-Wert von 7,6, für 20° berechnet, immer noch einem ein wenig sauereren Basen/Säure-Quotienten entspricht als in der Norm. Diese Periode fehlt in unseren eigenen Versuchen, da hier stets eine so tiefe Narkose angewandt wurde, daß die Thermoregulation von vornherein ausgeschaltet war. — Um die zweite *stark acidotische* Periode der direkten Kältewirkung erklären zu können, müssen wir das Wesen der schließlich zum Tode führenden Kältelähmung zu erkennen versuchen. Vor etwa 40 Jahren hat H. W. LANGENDORFF in unserem Laboratorium gezeigt, daß der Kältetod nicht durch eine Lähmung der Zentren-tätigkeit infolge der niederen Temperaturen bedingt, sondern ein *Erstickungstod* ist, der darauf beruht, daß Kreislauf und Atmung unzureichend werden. Denn bis zur Einstellung aller Lebenserscheinungen abgekühlte Meerschweinchen konnten wiederbelebt werden, wenn sie mit O₂-gesättigter RINGER-Lösung von der *gleichen* Temperatur, bei der der „Tod“ eingetreten war, künstlich durchspült wurden. Wir fanden ferner (WINTERSTEIN), daß erfrorene Kaninchen und Meerschweinchen oft noch nach geraumer Zeit wiederbelebt werden konnten, wenn es gelang, das Herz *in situ* wieder zum Schlagen zu bringen.

Erst 30 Jahre später ist v. WERZ bei seinen Untersuchungen über künstlich abgekühlte Tiere zur gleichen Schlußfolgerung gelangt, daß Sauerstoffmangel die Ursache des Kältetodes ist. Auf Grund der von BARCROFT festgelegten Beziehungen zwischen dem O₂-Bindungsvermögen des Hämoglobins, dem O₂-Druck und der Temperatur konnte v. WERZ glaubhaft dartun, daß der O₂-Druck des Blutes abgekühlter Tiere trotz O₂-Übersättigung desselben unzureichend ist, um den Bedarf zu decken. Offenbar ist, wie aus LANGENDORFFS Versuchen hervorgeht, mit reinem Sauerstoff gesättigte RINGER-Lösung unter diesen Bedingungen ein besserer Sauerstoffspender als Blut, das bei dem O₂-Druck der Luft mit Sauerstoff gesättigt ist, dessen Hämoglobin ihn aber nicht herzugeben vermag. Unter Übernahme der v. WERZschen Theorie hat dann neuerdings LUTZ (1) den günstigen Einfluß erhöhten Sauerstoffdrucks auf die Widerstandsfähigkeit gegen Kälte demonstriert und (2) die von uns beschriebene Wiederbelebbarkeit erfrorener Tiere wieder entdeckt.

Von dieser Erkenntnis aus, die die wesentliche Ursache des Kältetodes in Sauerstoffmangel infolge der Verschiebung der BARCROFTschen

Sauerstoff-Dissoziationskurve sieht, zu der noch die außerordentliche Verlangsamung der Herztätigkeit und der Atemfrequenz hinzukommt, gewinnen wir ein ganz neues Verständnis für die nach Ausschaltung der Wärmeregulation auftretenden *Acidose*, wie sie schon früher verschiedentlich, vor allem aber von OSBORN und in unseren eigenen Versuchen *ausnahmslos* beobachtet wurde. Das herabgesetzte O₂-Transportvermögen muß auch eine Herabsetzung der Fähigkeit zum CO₂-Transport mit sich bringen, da die hierzu benötigte Hämoglobinreduktion nicht in ausreichendem Maße erfolgt. Zu der durch die Herabsetzung des Stoffwechsels bedingten Verminderung der CO₂-Abgabe kommt also auch noch eine solche durch Erschwerung des Abtransportes hinzu.

So erklärt sich vielleicht der von OSBORN bei seinen Versuchen mit künstlicher Atmung bei Abfall der Temperatur unter 27° beobachtete steile Abfall der CO₂-Ausscheidung in der Expirationsluft von 5—6% auf oder manchmal sogar unter 1%. Wieso allerdings bei gleichbleibender künstlicher Atmung ein Abfall der CO₂-Abgabe mit einem Ansteigen der arteriellen CO₂-Spannung verbunden sein, es also zu einer gegensinnigen Änderung des CO₂-Druckes auf beiden Seiten der Alveolarwand kommen kann, ist schwer zu verstehen. Es müßte sich in der Tat, wie der Verf. annimmt, um eine in der Alveolarwand selbst gelegene Blockade handeln.

Auf jeden Fall ist, wie schon BIGELOW u. Mitarb. hervorgehoben haben, die *Kälte-Acidose* eine biologisch zweckmäßige Erscheinung, da sie die Reduktionsfähigkeit des Hämoglobins erhöht und so einerseits die Sauerstoffzufuhr zu den Zellen verbessert und andererseits den Kohlensäuretransport erleichtert. Auf diese Weise wird auch die von OSBORN betonte Schädlichkeit der anfänglichen alkalotischen Periode, wie auch der sowohl von BIGELOW wie von OSBORN festgestellte Nutzen eines Zusatzes von Kohlensäure zur Atmungsluft bei künstlicher Atmung verständlich. Der von OSBORN angenommene Zusammenhang zwischen der Überlebensfähigkeit der wiedererwärmten Tiere und dem Bicarbonatgehalt des Blutes könnte vielleicht darin bestehen, daß dieser letztere für die Herstellung der normalen Reaktionsverhältnisse nach „Lösung der CO₂-Blockade“ von Bedeutung ist. Es braucht nicht betont zu werden, daß ein gründliches Studium dieser zum Teil noch recht dunklen Verhältnisse für eine erfolgreiche Handhabung der Methode des „künstlichen Winterschlafs“ von größter Bedeutung ist.

Zusammenfassung.

Es werden die theoretischen Grundlagen der Reaktionsmessung bei verschiedener Temperatur dargelegt und die bisher kaum berücksichtigte Tatsache hervorgehoben, daß bei Temperaturwechsel der p_H allein nicht als Maß des Basen/Säure-Gleichgewichtes dienen kann. Als solches wird der Quotient $\frac{c_{OH}}{c_H}$ verwendet. Die an Kaninchen, Katzen und Hunden angestellten Versuche ergeben, daß in tiefer Narkose *Hyperthermie* die

Blutreaktion meist, aber nicht immer nach der *alkalischen*, *Hypothermie* sie *ausnahmslos* nach der *sauer*en Seite verschiebt.

Die Erörterung der alten und neuen Literatur führt zu folgender Vorstellung: Die bei *Hyperthermie* auftretenden Änderungen des Säure/Basen-Gleichgewichts sind die Wirkung zweier entgegengesetzter Faktoren: der durch die Stoffwechselsteigerung bedingten vermehrten Säurebildung, die die Blutreaktion nach der saueren, und der durch die Hyperpnoe bedingten Hypokapnie, die sie nach der alkalischen Seite verschiebt. — Bei *Hypothermie* kann die mit dem thermoregulatorischen Muskelzittern verbundene Hyperpnoe eine Phase relativer Alkalose erzeugen, auf die bei sinkender Körpertemperatur unabweislich eine acidotische Periode folgt. Bei Ausschaltung der Thermoregulation (wie sie in unseren Versuchen durch tiefe Narkose erfolgte) ist nur die zweite Phase zu beobachten. Die *Kälte-Acidose* steht offensichtlich in Zusammenhang mit dem eigenartigen Zustand von *Hypoxie*, in den der Organismus durch die starke Verlangsamung von Atmung und Kreislauf einerseits, und durch die Verminderung des Dissoziationsvermögens des Oxyhämoglobins andererseits versetzt wird. Diese Hypoxie ist auch die Ursache des *Kältetodes*. Die Acidose erscheint biologisch von Nutzen, da sie der Kälte Wirkung entgegenarbeitet, indem sie das Dissoziationsvermögen des Oxyhämoglobins, und dadurch sowohl die Sauerstoffzufuhr zu den Geweben wie den Kohlensäureabtransport von den Geweben, erhöht. Eine völlige Klärung der Verhältnisse ist jedoch noch keineswegs erzielt.

Literatur.

ADOLPH, E. F.: (1) The effects of exposure to high temperatures upon the circulation in man. *Amer. J. Physiol.* **67**, 573 (1923/24). — (2) Responses to hypothermia in several species of infant mammals. *Amer. J. Physiol.* **166**, 75 (1951). — AKIYA, M.: Klinische und experimentelle Studien über die anorganischen Salze und das Säurebasengleichgewicht im Blut beim Fieber. *Z. klin. Med.* **109**, 312 (1928). — BANUS, M. G.: The CO₂ absorption curve and buffer value of the blood in physical hyperthermia. *Amer. J. Physiol.* **88**, 509 (1929). — BAYER, G.: Regulation der Atmung. *BETHES Handb. d. Physiolog.* **2**, 272 (1925). — BAZETT, H. C.: Studies on the effects of baths on man. I. *Amer. J. Physiol.* **70**, 412 (1924). — BEHNKE, A. R., and C. P. YAGLOU: Physiological responses of man to chilling etc. *J. Appl. Physiol.* **3**, 591 (1951). — BIGELOW, W. G., W. K. LINDSAY, R. C. HARRISON, R. A. GORDON and W. F. GREENWOOD: Oxygen transport and utilization in dogs at low body temperatures. *Amer. J. Physiol.* **160**, 125 (1950). — BISCHOFF, FR., H. J. ULLMANN, E. HILL and M. L. LONG: Studies in hyperthermia induced by the high frequency electric current. *J. of Biol. Chem.* **85**, 675 (1930). — BISCHOFF, FR., L. LONG and E. HILL: Studies in hyperthermia II. The acid-base equilibrium in hyperthermia induced by short radio waves. *J. of Biol. Chem.* **90**, 321 (1931). — CAJORI, F. A., C. Y. CROUTER and R. PEMBERTON: The effect of therapeutic application of external heat etc. *J. of Biol. Chem.* **57**, 217 (1923). — CORDIER, D., et C. HEYMANS: Le centre respiratoire. p. 150. Paris: Hermann & Co. 1935. — DILL, D. B., and W. H. FORBES: Respiratory and metabolic effects of hypothermia. *Amer. J. Physiol.* **132**, 635 (1941). — ERÖZ, K., F. ÖZER u. H. WINTERSTEIN:

Blutzucker und Leberglykogen abgekühlter Säugetiere. Arch. internat. Pharmacodynamie 88, 63 (1951). — FLINN, F. B., and E. L. SCOTT: Some effects of various environmental temperatures etc. Amer. J. Physiol. 66, 191 (1923). — GOLLWITZER-MEIER, KL.: Die Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration. BETHES Handb. d. Physiol. 16, I, 1071 (1930). — GORDON, E. E., R. C. DARLING and E. SHEA: An evaluation of the question of anoxia in fever therapy. Arch. physical Med. 30, 154 (1949). — Effects of physical hypothermia upon blood gas equilibria in man. J. Appl. Physiol. 1, 496 (1949). — GRAY, J. S.: Pulmonary ventilation and its physiological regulation. Springfield (Ill.): Ch. Thomas 1950. — GROSSE-BROCKHOFF, F., u. W. SCHOEDEL: Das Bild der akuten Unterkühlung im Tierexperiment. Arch. exper. Pharm. Ther. 201, 417 (1943). — HAGGARD, H. W.: Hemato-respiratory functions VI. J. of Biol. Chem. 44, 131 (1920). — HATERIUS, H. O., and G. L. MAISON: Experimental hyperthermia and rewarming etc. Amer. J. Physiol. 152, 225 (1948). — HENDERSON, L. J.: Das Gleichgewicht zwischen Basen und Säuren usw. Ergebn. d. Physiol. 8, 254 (1909). — HEYMANS, C., et Ed. MAIGRE: Le bleu de méthylène, corps hyperthermisant. Compt. rend. soc. Biol. 85, 141 (1921). — Action hyperthermisante du bleu de méthylène. Arch. internat. Pharmacodynamie 26, 129 (1921). — Joos, G.: Über die Bezeichnung der Wasserstoffionenkonzentration in biologischen Versuchen. Klin. Wschr. 1929, 2129. — KOEHLER, A. E.: Acid-base equilibrium I. Clinical studies in alkalosis. Arch. Int. Med. 31, 590 (1923). — LANDIS, E. M., W. L. LONG, J. W. DUNN, C. L. JACKSON and U. MEYER: Studies on the effects of baths on man III. Amer. J. Physiol. 76, 35 (1926). — LANGENDORFF, H. W.: Das Überleben des Zentralnervensystems von Säugetieren bei künstlicher Durchspülung. Dissert. Rostock 1913. — LÖDE, A., u. J. BURTSCHER: Über das Verhalten der Alkalireserve bei Abkühlungen. Arch. f. Hyg. 102, 304 (1929). — LUTZ, W.: (1) Die experimentelle Verkaltblüterung des Warmblüters. Klin. Wschr. 1943, 727. — (2) Die experimentellen Grundlagen der Kältenarkose. Anaesthesist 2, 161 (1953). — MICHAELIS, L.: Die Wasserstoffionenkonzentration. S. 101/2. Berlin: Springer 1914. — OSBORN, J. J.: Experimental hypothermia: Respiratory and blood pH changes in relation to cardiac function. Amer. J. Physiol. 175, 389 (1953). — PETERS, J. P., and D. D. VAN SLYKE: Quantitative clinical chemistry. Interpretations. XVIII Carbonic acid and acid-base balance. London 1932. — ROSENHAIN, F. R., and K. E. PENROD: Blood gas studies in the hypothermic dog. Amer. J. Physiol. 166, 55 (1951). — ROSENTHAL, T. B.: The effect of temperature on the pH of blood and plasma in vitro. Biochem. J. 173, 25 (1948). — STADIE, W. C., J. H. AUSTIN and H. W. ROBINSON: The effect of temperature on the acid-base-protein equilibrium etc. J. of Biol. Chem. 66, 901 (1925). — STAEMMLER, M.: Über die Folgen der Abkühlung usw. Krankheitsforschung 8, 327, 427 (1930). Zit. nach Berichte ges. Physiol. 61, 790 (1931). — WERZ, R. v.: Sauerstoffmangel als Ursache des Kältetodes. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 202, 561 (1943). — WILSON, R. H.: pH of whole arterial blood. L. Labor. a. Clin. Med. 37, 129 (1951). — WINTERSTEIN, H.: Über Wiederbelebung bei Herzstillstand. Münch. med. Wschr. 1917, 153. — YLPPÖ, A.: pr-Tabellen. Berlin: Springer 1917.

Prof. Dr. HANS WINTERSTEIN, Istanbul/Türkei, Physiol. Inst. d. Univ.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. LENDLE).

Erzeugung einer Strophanthinüberempfindlichkeit des Herzens durch Aconitin.

Von
H. GÖING und W. BUSSE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 15. April 1954.)

In der klinischen Literatur finden sich zahlreiche Hinweise dafür, daß unerwünschte Änderungen der Reizbildung und der Reizleitung unter therapeutischer Digitalisdosierung auftreten können. Das Auftreten dieser „Digitalisüberempfindlichkeit“ ist besonders bei schwer geschädigten Herzen zu befürchten. Schon FRAENKEL wies in seiner Strophanthinmonographie darauf hin. Allerdings glaubte er, solche Zwischenfälle einer Strophanthinüberdosierung zuschreiben zu können. EDENS dagegen betonte, daß diese Überempfindlichkeit nicht an eine Überdosierung im üblichen Sinne gebunden ist. Er deutete sie als Folge besonderer Veränderungen des Herzens, die wiederum besondere Wirkungsbedingungen der Digitalisglykoside in therapeutischer Dosierung schaffen. Er beschrieb Bigeminien, Polygeminien und sogar ventrikuläre Tachykardien. Solche Überempfindlichkeitsreaktionen können nach EDENS durch Eintritt der „mittelbaren“ Digitaliswirkung gelegentlich behoben werden, wenn durch diese der Circulus vitiosus durchbrochen wird, der die Voraussetzungen zur Überempfindlichkeit schafft.

Tierexperimentell lassen sich gleiche Bedingungen schwer reproduzieren. Hier liegen im allgemeinen gesunde Herzen vor. Die für eine Überempfindlichkeit typischen Veränderungen erreicht man im allgemeinen durch Herzglykoside erst mit der fünffachen therapeutischen Dosis. Diese verschiebt sich jedoch zum therapeutischen Bereich, sobald man dem Herzen experimentelle Vorschädigungen zufügt. Aber nicht nur gegen Herzglykoside besteht dann eine erhöhte Empfindlichkeit, sondern auch gegenüber einer Reihe von anderen herzwirksamen Pharmaka (ROTHBERGER, u. ZWILLINGER, SCHERF 1926, 1929 (1) u. (2). Die Anfälligkeit zeigt sich vor allem im Auftreten aktiver ventrikulärer Rhythmen. Weshalb aber Digitalisstoffe an solchen Herzen andersartig wirksam werden, war bisher selten Gegenstand experimenteller Untersuchungen.

Während der Bearbeitung von Fragen über den Mechanismus der Digitalisbradykardie entstand bei uns die durch klinische Beobachtung gestützte Arbeitshypothese, daß das Herz unter tachykarden Arbeitsbedingungen eine größere Empfindlichkeit gegen Digitalisgaben haben könnte. Wir versuchten, dieser Frage näher zu kommen, indem wir pharmakologisch Tachykardien erzeugten und elektrokardiographisch die Wirkung niedriger Glykosiddosen (1—30% LD nach HATCHER) kontrollierten. Die zunächst an Meerschweinchen unter Urethannarkose durchgeführten Vorversuche zeigten, daß unter einer Aconitintachykardie die meisten Tiere selbst nach untertherapeutischen g-Strophanthingaben innerhalb weniger Minuten unter Kammerflimmern starben. Hier scheint also ein gegenseitiger Verstärkungseffekt vorzuliegen, der dem klinisch bekannten Phänomen der Digitalisüberempfindlichkeit ähnelt.

Die Wirkung des Aconitins auf den Herzmuskel wurde besonders eingehend von SCHERF am Warmblüter beschrieben. Erste genauere Einblicke verdanken wir HARTUNG, der am isolierten Froschherzen ohne das Hilfsmittel der Elektrokardiographie bereits alle gesetzmäßigen Stadien der Vergiftung beschrieb. Wirksame Aconitindosen führen am Froschherzen zu Tachykardien, Überleitungsstörungen, Arrhythmien und später zum Delirium cordis und Herzstillstand (HARTUNG, VON HUEBER). Der Herzstillstand soll nach großen Dosen in kurzer Zeit systolisch erfolgen, während er in kleinen wirksamen Dosen nach Stunden diastolisch auftritt (VON HUEBER). Der Vorhof ist weniger empfindlich und schlägt nach Stillstand der Kammermuskulatur noch weiter.

Zum Bild der Aconitinvergiftung am Warmblüter gehören gleichfalls Tachykardien, denen eine Bradykardie mit Blutdruckabfall vorausgehen oder folgen kann (VON HUEBER u. LEHR, MUNCH u. WOLFFE). Die Bradykardie wird entweder als Folge einer zentralen Vaguswirkung (SOLLMANN, GEILENKIRCHEN) oder auch als eine Sensibilisierung intrakardialer Rezeptoren gedeutet (AMMANN und JARISCH, GEILENKIRCHEN). Vergiftungsstadien mit voll wirksamen Aconitindosen zeigen auriculo-ventrikuläre Dissoziation, Bigeminien, Polygeminien und Kammerflimmern. Bei subletalen Dosen vollzieht sich die Erholung in umgekehrter Reihenfolge entsprechend den vorher erwähnten Vergiftungsstadien. HOTTINGER gibt als Dosis letalis minima bei Katzen in Äthernarkose 65 γ /kg/16 min Aconitin-Hydrochlorid an. Für den Tod der Tiere machte er in $\frac{1}{3}$ seiner Fälle eine zentrale Atemlähmung verantwortlich, während bei dem Rest mit nur mäßig herabgesetzter Atmung ein „Herztod“ eintrat. GEILENKIRCHEN konnte dagegen zeigen, daß es sich bei dieser Atmungshemmung durch Aconitin, ebenso wie beim BEZOLD-JARISCH-Reflex, um einen Angriff an peripheren Rezeptoren (Lunge) handelt und nicht um eine Lähmung des Atemzentrums. Für die Dosierung des Aconitins finden sich in der Literatur nicht immer übereinstimmende Angaben. Dies mag darauf beruhen, daß Aconitin in Lösungen wegen Esterspaltung nur begrenzt haltbar ist. Die auftretenden Spaltprodukte sollen nur $\frac{1}{2000}$ der Wirkungsstärke ihres Ausgangsproduktes besitzen (SOLLMANN).

Wir waren bemüht, die genaueren quantitativen und zeitlichen Wirkungsbedingungen zwischen Digitalis und Aconitin zu klären. Hierzu war es zunächst notwendig, Dosisabhängigkeit und Dauer der Aconitinwirkung zu studieren. Nach dem Abklingen der Wirkung wurden dann

die zeitlichen Bedingungen, unter denen wir die Überempfindlichkeitsreaktionen erhalten konnten, bestimmt. Darüber hinaus sollte die Abhängigkeit der gegenseitigen Wirkungsbedingungen von der Vagusinnervation und einer Digitalisvorbehandlung geprüft werden. Es interessierte ferner die Frage, ob auch am Kaltblüterherzen gleiche Verhältnisse nachzuweisen waren.

Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere dienten 7 Meerschweinchen und 31 Katzen in Urethannarkose (1,5 g/kg). Alle Versuche wurden unter künstlicher Beatmung durchgeführt, um eine aconitinbedingte Hypoxie zu vermeiden. Es stellte sich nämlich heraus, daß im Bereich der von uns angewandten Aconitindosen reversible Hemmungen der Spontanatmung eintraten, die die Dauer der Aconitinherzwirkung verlängerten. Alle Injektionen erfolgten in die Vena jugularis externa. Die Wirkung der injizierten Stoffe wurde an Hand der Herzaktionsstromkurve kontrolliert (Siemens Zweikoffgerät, II. Ableitung mit Hilfe von Nadelelektroden von der Innenseite der oberen Hälfte der Extremitäten)¹.

Es wurde ein amorphes Aconitinpräparat in einer alkoholischen Stammlösung 10^{-3} verwendet. Diese Lösung bewahrten wir maximal bis zu 5 Tagen im Eisschrank zur Herstellung einer frischen Endverdünnung 10^{-5} in RINGER auf. Die Digitalisglykoside wurden ebenfalls aus alkoholischen Stammlösungen hergestellt. Unsere Dosierungsangaben hierfür beziehen sich auf die letale Infusionsdosis, indem wir die Menge aller Einzelinjektionen in Prozent LD ausdrückten. Die den prozentualen Angaben zugrunde liegende Letaldosis ist Literaturangaben entnommen, auf die an den entsprechenden Stellen hingewiesen wird.

Wir untersuchten die Wirkungen von Aconitin bzw. verschiedener Herzglykoside nach Vorgabe des einen oder des anderen Stoffes. Weitere Angaben zur speziellen Versuchsanlage finden sich bei der Beschreibung der Versuchsergebnisse. Die nach Gabe eines Stoffes im Abstand von $\frac{1}{2}$, 1, 2 und mehr Minuten aufgenommenen Elektrokardiogramme wurden unter folgenden Gesichtspunkten ausgewertet:

a) Ort der Reizbildung und nötigenfalls der Reizausbreitung. Hierbei beschränkten wir uns im Interesse der übersichtlichen Darstellung in Tabellen auf den Sinusknoten, AV-Knoten oder die tertiären ventrikulären Reizbildungszentren.

b) Frequenz des führenden Reizbildungszentrums.

Versuchsergebnisse.

Ein Grundversuch soll die Verhältnisse einer g-Strophanthinüberempfindlichkeit wiedergeben und eingangs zum Verständnis der späteren Versuche ausführlich dargestellt werden.

Als Versuchstier diene ein Meerschweinchen mit einer Ausgangsfrequenz von 300/min im Sinusrhythmus (siehe Abb. 1). Es wurden 55 γ /kg Aconitin in 30 min infundiert. Diese Dosis war insofern reichlich bemessen, als bereits nach 35 γ /kg ventrikuläre Extrasystolen beobachtet wurden. Nach Infusionsende bestand ein Kammerflattern mit der Frequenz von 527/min. Wie warteten dann das Abklingen dieser Wirkung

¹ Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Gerätes.

ab, welches sich in einer stufenweisen Rückkehr zur normalen Reizbildung bei der gewählten Aconitindosis regelmäßig zeigte. Am Meerschweinchen beobachteten wir im allgemeinen eine schnellere Reversibilität der Aconitinwirkung als an der Katze. In dem dargestellten Versuch vollzog

sich die Rückkehr zum Sinusrhythmus über einen Bigeminus in etwa 10 min, wobei dann die Frequenz langsamer war als bei Versuchsbeginn. Wir gaben danach 2,5% der LD-g-Strophanthin¹. Für die Letaldosis am Meerschweinchen wurde nach HOFFMANN und LENDLE der Wert 0,25 mg/kg zugrunde gelegt. Die Injektionsgeschwindigkeit der intravenös verabfolgten Strophanthindosis war stets etwa 5 sec. Unter dieser Strophanthindosis kam es innerhalb von 10—15 sec zum Kammerflattern mit einer Frequenz von 509/min. Nach einer Minute bestand ein Bigeminus und nach 4 min eine Sinusarrhythmie.

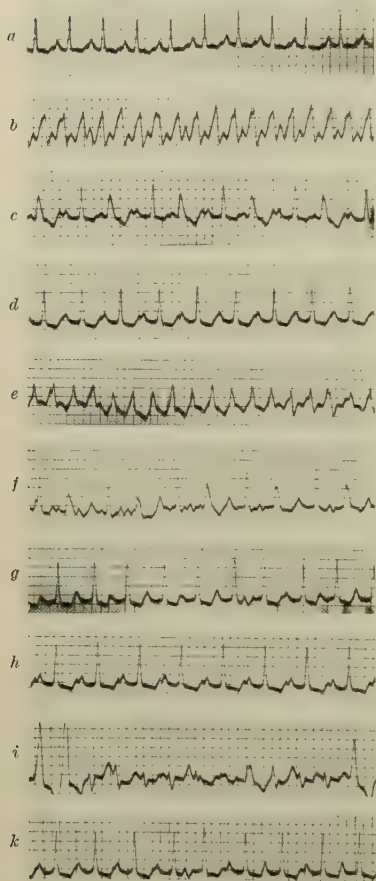


Abb. 1. g-Strophanthin nach Aconitin. Meerschweinchen, künstliche Beatmung, EKG in Ableitung II. a Regelmäßiger Sinusrhythmus, Frequenz 300/min; b nach 55 γ /kg in 30 min Aconitin i. v.: Kammerflattern Frequenz 527/min; c 5 min nach Infusionsende: Bigeminus, Frequenz 275/min; d 8 min nach Infusionsende: Sinusrhythmus Frequenz 261; e 20 sec nach Injektion von 2,5% LD g-Strophanthin (13 min nach Infusionsende): Kammerflattern, Frequenz 509/min; f 1 min nach Injektion von g-Strophanthin: Bigeminus, Frequenz 290/min; g 4 min nach Injektion von g-Strophanthin: Sinusarrhythmie, Frequenz 292/min; h 14 min nach Injektion von g-Strophanthin: regelm. Sinusrhythmus, Frequenz 235/min; i 30 sec nach erneuter Injektion von 2,5% LD g-Strophanthin (33 min nach Infusionsende): ventrikuläre Extrasystolen, Frequenz 388/min; k 2 min nach Injektion von g-Strophanthin: Sinusarrhythmie, Frequenz 266/min

Dieser auf eine Strophanthinüberempfindlichkeit deutende Zustand hielt längere Zeit an, obwohl die vorausgegangene Aconitininfusion keine charakteristischen Zeichen im EKG hinterlassen hatte. Eine Wiederholung der gleichen Strophanthindosis im Abstand von etwa 15 min zeigte die gleiche Wirkung.

Diese Beobachtung, die sich auch an Katzen leicht reproduzieren ließ, war Gegenstand der weiteren Untersuchungen.

¹ Verwandt wurde ein Präparat der Kali-Chemie-AG, Hannover.

I. Wirkungsbedingungen von g-Strophanthin und k-Strophanthidin nach Aconitinvorbehandlung.

Die Aconitindosierung geschah an Katzen entweder in Form einer Dauerinfusion, bis ventrikuläre Extrasystolen beobachtet wurden, oder es wurden 30 γ /kg Aconitin auf einmal injiziert, was sich im allgemeinen als ausreichend erwies. Reichte diese Dosis nicht aus (Altern der Lösung oder verschiedene Empfindlichkeit der Tiere), so wurden 5—10 γ /kg nachinjiziert. Dabei mußte beachtet werden, daß die Aconitinwirkung regelmäßig mit einer Latenz von 4—9 min auftrat. Die Aconitinwirkung wurde als abgeklungen angesehen, wenn die Reizbildung tertiärer Zentren mit Sicherheit mehrere Minuten aufgehört hatte. Nicht immer stellte sich dann sofort ein normaler Sinusrhythmus ein, sondern es konnte über verschieden lange Zeit ein Knotenrhythmus bestehen bleiben. Eine Erklärung für diese Differenzen von Tier zu Tier in den zeitlichen Restitutionsbedingungen bis zum Sinusrhythmus vermögen wir nicht zu geben, zumal auch Eliminationsberechnungen, die an späterer Stelle angeschlossen werden, hierfür keinen Anhalt geben. Da die Stimulierung tertiärer Zentren bei unseren Überempfindlichkeitserscheinungen unter Strophanthin im Vordergrund steht, und sich aus der tabellarischen Übersicht bei Bestehen eines Sinus- oder Knotenrhythmus keine verschiedenartigen Effekte nach der Gabe erkennen lassen, sehen wir keine Bedenken, beide Ausgangsrhythmen gleichwertig zu behandeln.

In der Tab. 1 finden sich nun die Wirkungen von g-Strophanthin und k-Strophanthidin in einer Anordnung dargestellt, die erstens die Frequenz des führenden Reizbildungszentrums nach dem Sensibilisierungsprozeß durch Aconitin wiedergibt, zweitens die entsprechenden Verhältnisse nach Gabe der beiden Stoffe in therapeutischen und untertherapeutischen Dosen zeigt. Außerdem werden die zeitlichen Wirkungsbedingungen hervorgehoben. Aus der Tabelle geht hervor, daß sich ab 2% der LD und in einem Falle sogar schon ab 0,7% tertiäre Reizbildungszentren mit einer höheren und zum Teil erheblich gesteigerten Frequenz als führendes Zentrum durchsetzen können. Diese Stimulierung tritt nach 10—20 sec post injectionem auf, erreicht nach 45—60 sec ihren Höhepunkt und klingt dann schrittweise innerhalb 4 min ab, sofern es sich nicht um ein zu stark vorgeschädigtes Tier handelt, bei dem die Dauer verlängert sein kann. Lag dagegen wie in einigen Fällen, die nicht in Tab. 1 angeführt sind, ein Versuchstier vor, das durch hohes Alter oder extrem starke Vorschädigung bereits vor der Glykosidgabe stärkere pathologische Veränderungen aufwies, die auch durch Abwarten nicht abklingen, so war eine Normalisierung nach Strophanthin innerhalb einer halben Stunde nicht zu beobachten.

Ein Großteil der Versuche wurde mit k-Strophanthidin ausgeführt, das wir Herrn Professor Dr. NEUMANN, Würzburg, verdanken. Das

Tabelle 1. *Beeinflussung der Reizbildung heterotoper Zentren durch Strophanthin und Strophanthidin nach abgeklungener Aconitinwirkung.*

Nr.	Gewicht g	Aconitin ¹ %/kg min	Aconitin- wirkung ab- geklungen ² min	Stoff	% der LD	Rhythmus u. Frequ./min		Beginn sec	Dauer min	Bemerkungen
						vorher	nachher			
1	683	55	30	g-Strophanthin	2,5	SR	VES 509	15	4	danach Big
			18	g-Strophanthin	2,5	SR	VES 388	10	2	
2	2330	36	45	g-Strophanthin	5,0	SR	VES 230	15	3	
		20	25	g-Strophanthin	5,0	KR	VES 242	20	4	
3	2880	25	25	g-Strophanthin	0,7	SR	VES 330	15	2	bis 8 min vereinzelte VES
4	2040	30	25	g-Strophanthin	10,0	KR	VES 338	20	10	vor Aconitin 10% LD Digitoxin
5	2230	30	70	k-Strophanthidin	10,0	Big	VES 338	20	2	
			8	g-Strophanthin	3,7	KR	VES 150	15	2	
			22	g-Strophanthin	5,0	KR	VES 234	15	3	
6	2780	40	40	k-Strophanthidin	5,0	KR u. SR	VES 360	12	5	
		30	12	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 300	20	2	
7	1550	35	15	k-Strophanthidin	5,0	KR	VES 330	17	2	
		30	20	k-Strophanthidin	5,0	KR	K-Big 212	30	2	
8	2800	30	22	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 130	20		
		30	90	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 221	20		
9	2600	30	150	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 218	15	über 3	
10	1610	30	2	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 332	15	3	
		30	25	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 228	20	1	
11	2420	30	15	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 157	20	über 3	
		30	88	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 220			

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Nr.	Gewicht g	Aconitin ¹ g/kg	Aconitin- wirkung ab- geklungen ² min	Stoff	% der LD	Rhythmus u. Frequ./min		Bemerkungen	
						vorher	nachher	Beginn sec	Dauer min
12	2300	30	36	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 180	20	2
			46	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 162	15	1
13	2250	35	50	k-Strophanthidin	5,0	KR	VES 182	10	4
14	2780	30	40	k-Strophanthidin	5,0	KR	VES 267	10	
15	1780	40	15	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 300	15	2
16	2210	40	7	k-Strophanthidin	1,0	KR	unverändert	—	—
			12	k-Strophanthidin	2,0	KR	VES 286	20	1
			48	k-Strophanthidin	5,0	SR	VES 233	15	3
			64	k-Strophanthidin	2,0	SR	VES 300	20	2

¹ Nur wenn Aconitin als Dauerinfusion gegeben wurde, ist die Injektionszeit angegeben. Andernfalls wurden akute Injektionen ausgeführt.

² Hier ist nicht die Zeit nach Injektion des Aconitins angegeben, sondern die Zeit nach Aufhören der ventrikulären Reizbildung.
 Abkürzungen. SR Sinusrhythmus, KR Knotenrhythmus; Big Bigeminus, K-Big Bigeminus mit AV-Knoten und Kammer als Reizbildungsstelle, VES ventrikuläre Extrasystolen. — Versuch 1 bezieht sich auf 1 Meerschweinchen, alle übrigen auf Katzen.

Genin des k-Strophanthins schien uns wegen seiner raschen Eliminierbarkeit für unsere Versuchszwecke geeigneter als das Vollglykosid. Nach LENDLE werden von k-Strophanthidin 25% der LD in einer Stunde eliminiert, so daß wir in der Lage waren, Einzelinjektionen in Abständen von 15—30 min mit den von uns angewandten Dosen auszuführen, ohne daß wir Kumulationserscheinungen zu befürchten hatten. Unterschiede zwischen g-Strophanthin und k-Strophanthidin bestanden auch insofern, als letzteres mit größerer Sicherheit eine tertiäre Reizbildung hervorrief. Dies äußerte sich darin, daß in der Phase des Abklingens des Sensibilisierungszustandes k-Strophanthidin noch wirksam gefunden wurde, wenn g-Strophanthin nur noch in höherer Dosierung (> 5% LD) Effekte hervorzurufen vermochte.

Wir legten die von LENDLE nach HATCHER titrierte LD von 0,37 mg/kg zugrunde. Ausführliche Untersuchungen von WALTHER (1940 (1) u. (2), 1941) lassen bezüglich der Digitaliswirkung im EKG keine

qualitativen Unterschiede im Vergiftungsablauf zwischen den verschiedenen Herzglykosiden und ihren Aglykonen erkennen. Lediglich der Eintritt der verschiedenen Wirkungsphasen zeigt sich im EKG bei den Geninen früher. So traten Frequenzwirkungen beim k-Strophanthidin schon ab rund 25% der LD auf und erste Extrasystolen ab 21,9%, während sie beim k-Strophanthin sich erst ab 53% zeigten. Es muß jedoch erwähnt werden, daß WALTHER (1943) die titrierte LD für k-Strophanthidin an Katzen um etwa 27% niedriger angibt als LENDLE. Aus seiner Mitteilung sind allerdings nicht die angewandten Infusionsgeschwindigkeiten ersichtlich. Dennoch liegt die von uns gebrauchte Dosis von 5% der LD, die sich auf die Angaben von LENDLE stützt, weit unterhalb des von WALTHER (1943) angegebenen untersten frequenzwirksamen Bereiches.

Wir sicherten uns sodann gegenüber dem möglichen Einwand, daß die bei uns in schneller Injektionszeit gegebenen Genindosen möglicherweise auch ohne Vorbehandlung ebensolche Wirkungen hervorrufen könnten. Wir injizierten hierzu an Tieren ohne Vorbehandlung in Abständen von 1 min solange unsere angenommene 5% LD-Dosis des k-Strophanthidins bis ventrikuläre Extrasystolen zum Vorschein kamen. An 7 Versuchstieren ließ sich zeigen, daß bei dieser schnellen Injektionsfolge für k-Strophanthidin eine Dosis zwischen 15 und 20% der LD benötigt wurde. In zwei Versuchen waren es sogar 30% der LD; aber in keinem Falle ließ sich eine toxische Wirkung bis zu 10% der angenommenen LD-Dosis erzielen. Mit diesen Werten liegen wir in annähernder Übereinstimmung mit WALTHER (1943).

Es sollen ferner einige Versuche Erwähnung finden, bei denen Strophanthidin in der üblichen Dosierung bei noch nicht abgeklungener Aconitinwirkung injiziert wurde. Die Wirkungen waren in diesen Fällen grundsätzlich den vorigen gleich. Bestand bereits ein wenig frequenter extrasystolischer Rhythmus, so wurde dieser durch Strophanthidin wiederum zu einer höheren Frequenz angeregt. Diese Stimulierung trat weniger deutlich hervor, wenn unter Aconitin bereits eine maximale Beschleunigung hervorgerufen war.

II. Wirkungsbedingungen von Aconitin und Strophanthidin unter Vagusausschaltung.

Dieser Gesichtspunkt erschien uns deshalb bedeutungsvoll, weil es durch gewisse Wirkungskomponenten beider Stoffe zur Beeinflussung afferenter und efferenter Leistungswege im Vagus kommen kann.

GEILENKIRCHEN hob hervor, daß Aconitin bei vorsichtiger Dosierung den BEZOLD-JARISCH-Reflex auslöst und bewies dies unter anderem an Hand der Reversibilität der Wirkungen durch temporäre Vagusausschaltung. Es zeigte sich außerdem, daß dieser Vagusreflex bedeutungslos ist, sobald es unter der Aconitingabe zu stärkerer ventrikulärer Extrasystolie gekommen war. Auf die Abhängigkeit der Aconitinatmungshemmung von der Leitfähigkeit des Vagus wurde bereits hingewiesen.

Auch die Geschwindigkeit und Kurzfristigkeit der Wirkungen nach Strophanthin oder Strophanthidin könnte an reflektorische Vorgänge denken lassen. Neuere Untersuchungen von BUSSE und LOENNECKEN zeigten, daß die toxische Digitalisbradykardie als kardio-kardialer Reflex aufgefaßt werden kann. Somit sind für

beide Stoffe grundsätzlich ähnliche Wirkungsmöglichkeiten auf zwei Funktionsgebieten des Herzens in Betracht zu ziehen. Sie vermögen über den Vagus den Bradykardiareflex hervorzurufen und die tertiären Zentren bis zum Auftreten einer aktiven Heterotopie zu stimulieren. Inwieweit diese beiden Wirkungskomponenten Ausdruck einer funktionellen Verwandtschaft oder ein und derselben Schädigung sind, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Beachtenswert hierzu sind die Beobachtungen von SCHERF (1928), der nach unterschwelligen Aconitindosen ventrikuläre Extrasystolen durch Vagusreizung hervorrufen konnte. Hierbei liegt allerdings der Gedanke nahe, daß unter einer Sinusbradykardie durch Vagusreizung die bereits vorhandene Stimulierung tertiärer Zentren in Form einer passiven ventrikulären Heterotopie leichter zum Vorschein kommt.

Der gesetzmäßige Ablauf einer letalen Infusion von Digitalis im EKG-Bilde läßt sich durch Vagusausschaltung nicht wesentlich beeinflussen. Lediglich die ersten Stadien der Vergiftung, die sich vorwiegend an der Reizbildung des Vorhofes und der Reizleitung im Knoten abspielen und somit in gewissem Maße unter Vaguseinfluß stehen, zeigen durch Vagusausschaltung eine begrenzte Beeinflußbarkeit (WALTHER 1941).

In Tab. 2 wurde die Abhängigkeit der Dauer der Aconitinwirkung von der Vagusausschaltung durch cervicale Vagotomie oder durch Atropin dargestellt. Als weiteren Gesichtspunkt enthält die Tabelle die Dauer der Überempfindlichkeit gegenüber Strophanthin unter den üblichen Bedingungen mit und ohne Vagusausschaltung. Deutlich zeigt sich, daß die Dauer des Aconitineffektes unter Vagusausschaltung verkürzt ist. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß nach Vagusausschaltung eine Tachykardie nomotopen Ursprungs eher die in den Kammern sich nur langsam zurückbildende Stimulierung tertiärer Zentren zum Auslöschen bringt.

Die Strophanthidinwirkung nach Sensibilisierung ist durch Vagusausschaltung qualitativ und quantitativ nicht beeinflussbar. Wir sahen keine Änderung im Ablauf der frequenten tertiären Reizbildung nach der Injektion. Um eine Aussage über das Andauern der Sensibilisierung zu machen, stellten wir in unseren Versuchen die extremen zeitlichen Bedingungen dar. Es zeigte sich hierbei eine große zeitliche Streuung, und da die Untersuchung der zeitlichen Bedingungen nicht so systematisch durchgeführt wurde, konnte keine sichere Aussage darüber gemacht werden, ob unter Vagusausschaltung die Sensibilisierungsdauer vielleicht verändert war.

III. Ablauf der Aconitinvergiftung nach Digitalisvorbehandlung.

Nachdem wir die zuvor beschriebene Sensibilisierung für Strophanthin und Strophanthin gefunden hatten, interessierte uns die Frage, ob vielleicht auch eine umgekehrte Sensibilisierung vorhanden wäre. Wir legten daher zuerst ohne irgendwelche Vorbehandlung die Aconitindosen unter verschieden schneller Dauerinfusion fest, die zu einer Frequenzänderung im Sinne einer Tachykardie oder auch Bradykardie (in einigen Fällen) führte (siehe Tab. 3). Ferner wurde festgelegt, bei welcher Dosis es zur ventrikulären Extrasystolie kam. Diese an Katzen und

Tabelle 2. *Einfluß des Vagus auf die Aconitineigenvirkung und die Sensibilisierung für k-Strophanthidin.*

Nr.	Gewicht in g	Vorbehandlung	Aconitgabe		Strophanthidinwirkung					
			γ/kg	min	Dauer der Eigen- wirkung, Rhythmus nach min	% LD	Überempfindlichkeit min nach Aconitgabe	Bemerkungen		
1	2250		35		SR	88	5	noch nach	120	
2	2420		30		SR	58	5	noch nach	148	
3	1610		30		SR	76	5	nur bis	85	
4	2600		30		SR	94	5	noch nach	285	
5	2040		30	25	SR	136	10	nur bis	270	auf 5% LD nicht mehr ansprechbar
6	2210		40		SR	51	5	noch nach	120	
7	2460	Vagotomie	30		VES über	80 ¹				weiter nicht beobachtet ¹
8	1780	Vagotomie	30		SR	28	5	noch nach	80	
9	1350	Vagotomie	40		SR	31	5	nur bis	135	
10	2930	Vagotomie	50	8	SR um	30	5	noch nach	50	
		1 mg/kg Atropin	30		VES über	108 ¹				weiter nicht beobachtet ¹
		1 mg/kg Atropin	30		SR	24	5	keine Wirkung nach	155	
11	2980	1 mg/kg Atropin	30	30	SR	16				Strophanthidin nicht geprüft
12	2270	1 mg/kg Atropin	22	23	SR	65				Strophanthidin nicht geprüft
13	2925	1 mg/kg Atropin	30	30	SR	16				Strophanthidin nicht geprüft

¹ Abkürzungen und Anmerkung siehe Tab. 1.

Tabelle 3. *Einfluß einer Digitalisvorbereitung auf die Aconitinherzwirksamkeit.*

Nr.	Tierart	Gewicht g	Vorbehandlung		Frequenz/min		Aconitin						Bemerkungen	
			Stoff	Do- sierung γ/kg	vorher	nachher	Gesamtdosis γ/kg	Teildosierung bis Frequenzänderung		Teildosie- rung bis VES γ/kg	min			
								min	γ/kg/min			Frequ./min		
1	K	2040	Digitoxin	36	160	153	30	25	17,5	14	229	30	25	5 min nach Infusionsende ¹ 5 Std nach Digitoxin ¹
2	K	2925	Digitoxin	84	112	165 178 ¹	20	10	20	10	182 ¹ 214	23	23	
3	K	2345	g-Strophanthin	10	164	170	36	45	24,6	30	120	36	45	5 min nach Infusionsende ¹
4	K	2500	g-Strophanthin	25	188	184	25	20	20	16	169	25	20 ¹	
5	M	683	g-Strophanthin	12,5	239	222	46	26	18	10	303	30	17	
6	M	566			214		62	20	19	6	306	30	10	5 min nach Infusionsende ¹
7	M	683			300		55	30				36	20	
8	K	2270			125		22	21	17	16	172	22	21	
9	K	2100			158		38	45	21	25	195	24	29	2 min nach Infusionsende ¹
10	K	1750			139		48	30	24	15	166	26	16	
11	K	2330			200		36	45	20	25	218	30	38	
12	K	1700			218		35	26	20	15	260	35	26 ¹	

Abkürzungen siehe Tab. I. M bedeutet Meerschweinchen, K Katzen.

Meerschweinchen festgestellten Werte verglichen wir mit den entsprechenden aus Versuchen an Tieren, die mit Digitoxin (2 Versuche) oder g-Strophanthin (3 Versuche) vorbehandelt waren. Es stellte sich heraus, daß es in beiden Fällen zwischen etwa 17—24 γ /kg Aconitin zu einer Frequenzänderung kam. Die Teildosierung bis zum Auftreten von ventrikulären Extrasystolen zeigt ebenfalls keine Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen. Zwischen 22—36 γ /kg kam es zum Auftreten entsprechender EKG-Veränderungen. Die Streubreite läßt unter keinen der beiden beobachteten Kriterien eine Abhängigkeit von der Vorbehandlung erkennen. So müssen wir eine Vorbehandlung mit Digitoxin und g-Strophanthin in therapeutischem Dosenbereich als ohne Einfluß auf den Ablauf der Aconitinvergiftung ansehen und die Frage der Aconitinsensibilisierung durch Digitalis verneinen.

IV. Überempfindlichkeit gegen andere Pharmaka.

In einigen Fällen benutzten wir nach der Sensibilisierung statt Strophanthin Digitoxin, ebenfalls in der Dosierung 5—10% der LD (LD 0,47 mg/kg Digitoxin nach WALTHER 1943). Es stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Versuchen keine ebensolche Überempfindlichkeit wie gegen Strophanthin bestand¹.

Im Versuch 4 der Tab. 1 zeigte sich, daß die g-Strophanthin- und k-Strophanthidin-Wirkung trotz einer Vorbehandlung mit 10% LD Digitoxin unverändert vorhanden war. In ähnlichen Versuchen mit einer g-Strophanthin-Vorbehandlung ergab sich ebenfalls keine Veränderung der späteren Sensibilisierungsprüfung.

Die pathologische Funktionsbereitschaft des Herzens nach abgeklungener Aconitinwirkung ließ sich auch durch einige andere Stoffe sichtbar machen. In 3 Versuchen gaben wir Sympatol (p-Oxyphenyl-äthanol-methylamin) in der Dosierung von 2,5—10 mg/kg unter den gleichen Sensibilisierungsbedingungen. In allen Fällen kam es zu gleichen Effekten wie nach Strophanthin. Auch die zeitlichen Verhältnisse unterschieden sich nicht. In gleicher Weise prüften wir Hypophysin in der Dosierung 0,2 VE/kg, das neben einer Blutdrucksteigerung (wie Sympatol) auch eine Coronarverengung hervorruft. Wir konnten damit grundsätzlich die gleichen Wirkungen beobachten. Die Dauer der extrasystolischen Wirkung war allerdings bei 3 Versuchen deutlich länger (4—15 min). Bei zwei aufeinanderfolgenden Gaben von Hypophysin erwies sich die letzte als tachyphylaktisch.

Als Kontrollversuche schlossen wir mehrmalige Injektionen großer Mengen RINGER-Lösung mit der üblichen Injektionsgeschwindigkeit an (bis 10 cm³). Außer einer mäßigen vorübergehenden Sinusfrequenzbeschleunigung wurden keine Wirkungen erzielt.

¹ Über andere Digitalisstoffe vgl. Mitteilung III.

V. Kombinierte Wirkungen von Aconitin und Herzglykosiden am Straubherzen.

Bei diesen Versuchen an Esculentenherzen (Juni/Juli 1953) richteten wir unser Augenmerk vorwiegend auf das Verhalten der Herzfrequenz, nachdem am Warmblüter in situ eine Steigerung der ventrikulären Automatie als charakteristisch gefunden war.

Die gegenseitigen Verstärkungsbedingungen am Straubherzen wurden bereits von v. HUEBER, allerdings mit dem Kriterium des Herzstillstandes und der Kontrakturneigung, untersucht. Er arbeitete neben dem Aconitin mit Digitoxin, Digilamid, k- und g-Strophanthin, Scillaren und Folinerin. Beurteilt wurde von ihm der Zeitpunkt des Auftretens einer Kontraktur, ihr Ausmaß und ihre Dauer. Er fand in allen Fällen durch Vorbehandlung oder gleichzeitige Applikation von Aconitin 10^{-7} eine deutliche Verstärkung des entsprechenden Digitaliseffektes. Dabei wurde diese Aconitindosis, die für sich allein gegeben unwirksam war, besonders durch Digitoxin und Digilamid verstärkt, weniger oder kaum dagegen durch die übrigen Präparate. Außerdem stellte er in Passageversuchen unter Verwendung mehrerer Herzen fest, daß Aconitin nicht durch eine Zunahme der Digitalisbindung eine verstärkende Wirkung erlangte. Gleiche Wirkungen im Sinne einer Verstärkung nach Aconitinvorbehandlung fand er für Kaliumchlorid, Acetylcholin, Pilocarpin und Adrenalin. Hierbei wurde vor allem die mit Beginn der Kontrakturnstellung sich einstellende Frequenzsteigerung erwähnt.

Bei unseren Versuchen wurde das isolierte Froschherz zuerst über verschieden lange Zeiten (bis 60 min) Aconitin oder g-Strophanthin bzw. Digitoxin zwischen 10^{-7} und 10^{-6} ausgesetzt und danach die Lösung gegen eine entsprechende andere ausgetauscht. Die Frequenzänderung nach Austausch der Lösung wurde beurteilt. Es zeigte sich, daß nach einer Aconitinvorbehandlung von 10^{-6} , die von HARTUNG als die unterste wirksame Konzentration angegeben wird, g-Strophanthin (in der Konzentration ebenfalls von 10^{-6}) sofort zu einer Tachykardie führt, die innerhalb von 10—30 min mit einem systolischen Herzstillstand endet. Bei Zusatz von Digitoxin 10^{-6} unter gleichen Bedingungen kam es dagegen eher zu einer Frequenzabnahme. Der systolische Herzstillstand trat zwischen 5 und 15 min ein. Auf den Unterschied zwischen g-Strophanthin und Digitoxin in der Beeinflussung der Frequenz am Warmblüterherzen nach vorausgegangener Aconitineinwirkung wurde schon hingewiesen. Es konnte also ein gleiches Verhalten von g-Strophanthin und auch die andersartige Wirkung von Digitoxin am Kaltblüter gezeigt werden. Auf welcher Reizbildungsbeeinflussung die Frequenzänderungen beruhten, vermögen wir im einzelnen nicht zu beurteilen, da wir kein EKG aufnahmen.

Bei einer Vorbehandlung mit g-Strophanthin oder Digitoxin in gleichen Konzentrationen und nachträglicher Zugabe von Aconitin zeigte sich dagegen keine verschiedene Wirkung. Es trat, falls Aconitin wirksam dosiert wurde, sowohl nach Strophanthin, als auch nach Digitoxin der für Aconitin typische Vergiftungsablauf ein. Dieser führte über eine Tachykardie und Rhythmusstörungen zum Herzstillstand. Infolge der kombinierten Schädigung durch beide Stoffe war sein Eintritt besonders nach Digitoxinvorbehandlung deutlich verfrüht und mit systolischer Tendenz verbunden.

Hiermit sahen wir unsere vorausgehenden Warmblüterversuche bestätigt, wonach eine Digitalisvorbehandlung keine grundsätzliche Änderung der Wirkung des Aconitins (im Hinblick auf heterotope Reizbildung) auszuüben vermag. Sie stimmen überein mit den älteren Befunden von v. HUEBER, wonach sich die systolische Digitaliswirkung am Froschherzen durch Aconitin verstärken läßt. Wenn v. HUEBER keine Frequenzbeobachtung hervorhebt, so mag das daran liegen, daß er mit einer Aconitindosierung gearbeitet hat, die eine Zehnerpotenz niedriger lag.

Diskussion der Ergebnisse.

Die unter unseren Versuchsbedingungen durch Aconitinvorbehandlung auftretende Überempfindlichkeit des Herzens gegenüber g-Strophanthin und k-Strophanthidin soll im Zusammenhang mit dem klinischen Phänomen der sogenannten „Digitalisüberempfindlichkeit“ diskutiert werden. Dabei erscheint uns zunächst die Feststellung wichtig,

1. daß sich die schon von ROTHBERGER und WINTERBERG für das Strophanthin beschriebene Steigerung der Reizbildung tertiärer Zentren nachweisen ließ, und zwar in einer Dosierung, die am nicht vorbehandelten Herzen völlig wirkungslos bleibt,

2. daß dieser Effekt als Sofortreaktion auftritt und kurzfristig wieder abklingt, somit also zeitlich nicht mit der eigentlichen therapeutischen langsamer eintretenden Strophanthinwirkung am Herzmuskel zusammenfällt. Diese Feststellung spricht vielleicht für eine Membranwirkung von Strophanthin, wobei die Bindung noch nicht im Sinne einer chemischen Fixierung erfolgen muß (vgl. „Membranphase“ FISCHER).

Veränderungen des Herzrhythmus unter einer Strophanthininfusion an Katzen fanden SCHLEUSING, sowie HOEKSTRA und SCHLEUSING nach 75,6% der tödlichen Grenzdosis, während Extrasystolen bei ihnen zwischen 14,6 und 45,8% der LD auftraten. LEVINE registrierte die ersten Extrasystolen unter g-Strophanthin zwischen 25 und 60% der tödlichen Grenzdosis, LEVINE und CUNNINGHAM bei 48%. Ventrikuläre Automatie beobachteten sie ab 70%. Ventrikuläre Tachykardien lassen sich aber auch am Menschen durch eine Digitalismedikation hervorrufen. In der klinischen Literatur finden sich hierfür zahlreiche Hinweise (MOLL). Dabei wird dem Strophanthin eine besondere Rolle zugeschrieben. Einheitlich ist die Auffassung, daß eine Herzmuskelschädigung die Entwicklung von Reizbildungsstörungen begünstigt.

Welches aber sind die Voraussetzungen, unter denen sich nach der Aconitinvorbehandlung die intravenöse Strophanthingabe in dem beschriebenen Sinne auswirken kann? Hierzu möchten wir zuerst die bekannten Wirkungsbedingungen des Aconitins diskutieren. Legen wir die von HOTTINGER angegebene Eliminationsrate von $0,8\gamma/\text{kg}/\text{min}$ zugrunde, so wären nach rund 40 min keine wesentlichen Aconitinmengen mehr für den Zustand der Sensibilisierung verantwortlich zu machen. In den meisten Fällen war in unseren Versuchen bis zum Abklingen der Aconitinwirkung jedoch eine längere Zeit abzuwarten (vgl. Tab. 2). Der Zustand der Überempfindlichkeit hielt dagegen $1\frac{1}{2}$ —4 Std nach Aconitinalgabe an. Es kann wohl angenommen werden, daß die Eliminationskurve einen exponentiellen Charakter hat, so daß der Eliminationswert von $0,8\gamma/\text{kg}/\text{min}$, auf die ganze Zeit veranschlagt, ein falsches Bild vermitteln würde. Aber auch unabhängig von noch vorhandenen Restbeständen des Aconitins im Herzen kann man annehmen, daß nach einem abgeklungenen pathologischen Reizbildungsvorgang längere Zeit eine

Bereitschaft zu erneuter ventrikulärer Rhythmusstörung im Sinne einer Sensibilisierung besteht.

Dies ist kein unbekanntes Phänomen. DAWES⁷ berichtet ausführlich über diesen Begriff der „Supernormality“. Hierunter ist eine Phase übernormaler Erregbarkeit zu verstehen, die auch von ADRIAN (1920, 1921), WASTL, sowie HOFF und NAHUM erwähnt wird. SEEGERs beschäftigte sich mit diesem Phänomen und stellte fest, daß im EKG bei unipolarer Ableitung zugleich negative Nachpotentiale gefunden werden. Solche negativen Nachpotentiale sah SEEGERs (1941 1 u. 2) am Froschherzen nach Aconitin, Veratrin, Adrenalin, Strophanthin und Digitalis. GOLDBERG und ROTHBERGER (1938) dagegen, die ihre Untersuchungen an isolierten PURKINJE-Fäden des Hundes durchführten, betonen, daß sie diese nach Aconitin und Strophanthin nicht sahen, während sie bei Arsen, Bariumchlorid und besonders nach Veratrin vorhanden waren. Auch ROTHSCHUH erwähnte die Bedeutung dieser negativen Nachpotentiale für das Entstehen von Extrasystolen.

Andererseits ist zu diskutieren, daß ein Herz, welches längere Zeit unter tachysystolischen Bedingungen arbeitet, vielleicht infolge einer relativen Coronarinsuffizienz hypoxämische Schädigungen erleidet. Dabei dürfte es auch zu Störungen des intermediären Stoffwechsels kommen. Eine Hypoxie aber schafft am Herzmuskel Bedingungen, die zu ventrikulären Extrasystolen disponieren (EDENS, DAWES).

Möglicherweise vermag die Betrachtung des Aconitins unter dem Gesichtspunkt des von BACQ und Mitarbeitern herausgearbeiteten pharmakologischen Begriffes der „Kaliumsensibilisatoren“ hier auch zusätzliche Erkenntnisse zu geben. Bei der Bedeutung der Ionenverhältnisse für die Herztätigkeit liegt die Möglichkeit einer Störung dieses Gleichgewichtes im Zustand der übernormalen Erregbarkeit unter Aconitin nahe. ROTHSCHUH (1947) konnte nachweisen, daß Calciumentzug am Froschherzen die Neigung der Membranen zu spontaner Depolarisierung, die normalerweise nur dem spezifischen Leitungsgewebe am Herzen zukommt, auch auf die übrigen Muskelemente übertragen werden kann. Aber auch mechanische Faktoren, wie Dehnung und Verletzung, können eine Kaliumfreisetzung bewirken. SEEGERs (1941) (2) beschrieb das Auftreten negativer Nachpotentiale auch unter Dehnung des Herzens durch Steigerung des intrakardialen Druckes. Somit können diese Faktoren über eine Änderung des Polarisationsgrades zur Ursache einer Extrasystolie werden. Die Parallelen zur Klinik sind hier in Form von Dilatation, Entzündung, Nekrose oder Nekrobiose gegeben. Da der geschädigte Herzmuskel gegen Digitalis aber sehr viel anfälliger ist, ist nach ROTHSCHUH (1952) eine Sensibilisierung für das herzmuskeleigene Kalium durch Digitalis zu diskutieren.

Wie aus den vorangehenden Überlegungen hervorgeht, können also mehrere Ursachen für die Bedingungen verantwortlich gemacht werden, die sich in einer Sensibilisierung gegenüber Strophanthin äußern können.

Im Hinblick auf die mögliche wechselseitige Beeinflussung der Herzgifte in der Kombination verdient es besonders hervorgehoben zu werden, daß der Vergiftungsablauf für Aconitin nach einer g-Strophanthin- bzw. Digitoxinbehandlung keine qualitative und quantitative Änderung erfährt. Lediglich am Froschherzen kommt es durch Addierung der Schädigungen zu einem früheren systolischen Stillstand, worauf schon früher v. HUEBER hingewiesen hat.

Digitoxin erzeugt in äquivalenter Dosis nach Aconitinvorbehandlung keinen ventrikulären Rhythmus und auch die Versuche am Froschherzen weisen ebenfalls auf solche Unterschiede zwischen Strophanthin und Digitoxin hin. Diese Unterschiede finden eine Parallele in der verschiedenen Eiweißbindungsfähigkeit beider Glykoside im Blut (HAARMANN, HAGEMEIER und LENDLE). Zur vollständigen Erklärung dürfte allerdings dieses nicht ausreichen, da sich eine unterschiedliche Wirkung auch am isolierten Froschherzen zeigt.

Zur Frage der von uns am Herzen geschaffenen Bedingungen für die Entstehung ventrikulärer Tachykardien war ferner zu klären, inwieweit reflektorische Vorgänge von Bedeutung sind. In unspezifischer Art könnten sie über eine brüske Blutdrucksteigerung wirken, wie durch die Sympatolversuche gezeigt werden konnte. Besonders hochgradig tritt die Reaktion beim Hypophysin zum Vorschein, wenn dazu noch eine Drosselung der Coronardurchblutung erzeugt wird.

Diese Ergebnisse überraschen nicht, denn bekanntlich ist die experimentelle Flimmererzeugung mittels Chloroform-Adrenalin ein weit verbreitetes Verfahren, dem wohl grundsätzlich ähnliche Bedingungen zugrunde liegen (LEVY 1911, 1913). Wir glauben allerdings, daß solche Vorstellungen zur Erklärung der Strophanthineffekte nicht ausreichen. Wie wir zeigen konnten, waren bereits 0,7—2,0% der LD g-Strophanthin bzw. k-Strophanthidin wirksam, d. h. Dosengrößen, deren Wirkung nur über eine spezifische Steigerung der tertiären Reizbildung erklärt werden kann. Für diese Vorstellung sprechen auch die Arbeiten von ISHIHARA und PICK, STRASSER, sowie von GOLDBERG und ROTHBERGER (1937), die an isolierten PURKINJE-Fäden des Hundes bzw. der Katze Automatieerzeugung oder Frequenzsteigerung durch Strophanthin sahen.

Da SCHERF (1928) durch Vagusreizung die Aconitinwirkung verstärken konnte, dehnten wir unsere Untersuchungen auch auf vagotomierte Tiere aus. Es ließ sich dadurch lediglich eine deutliche Verkürzung der Aconitineigenwirkung erzielen, die wir auf die höhere Sinusfrequenz zurückführten. Ein Einfluß auf den Zustand der Sensibilisierung gegenüber Digitalis ließ sich nicht erkennen. Entsprechend den anerkannten Vorstellungen wird die Herzkammer des Warmblüters nicht durch Vagusfasern versorgt (WOOLLARD, ROTHSCUH 1952). Somit kann über diese Bahnen auch kein unmittelbarer Einfluß auf ihre Reizbildung ausgeübt werden. Der sehr schnelle Wirkungseintritt läßt daher eher an eine direkte Beeinflussung der Membranpolarisation denken.

Eine solche Beeinflussung innerhalb von 2—3 sec wurde auch neuerdings von TRAUTWEIN als Reaktion auf die Injektion von $\frac{1}{8}$ mg Strophanthin nachgewiesen. Er hatte durch Chinidinvorgiftung des Herzens eine künstliche Insuffizienz geschaffen und an einzelnen Muskelfasern in situ einen verbreiterten Differentialaktionsstrom gesehen, der wiederum schlagartig durch Strophanthin im Sinne der Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit durch Änderung der Membranpolarisation beeinflusst wurde. FISCHER untersuchte am Froschherzen die zeitlichen Wirkungsbedingungen von Digitalis und unterschied eine Membranphase, eine Fixationsphase

und eine Wirkungsphase. Die Membranphase charakterisiert er als höchstens einige Sekunden dauernd; sie tritt sofort nach Kontakt mit Digitalisstoffen ein. Die Membranphase ist gegenüber der Fixationsphase reversibel und wird von ihm als Grenzflächenvorgang physikalisch-chemischer Art im Sinne einer Absorption oder einer Diffusion durch die Grenzmembran aufgefaßt. Möglicherweise handelt es sich bei unseren Effekten um die funktionelle Auswirkung gleicher Vorgänge unter den durch die Aconitinsensibilisierung geschaffenen Voraussetzungen, die die Membranstabilität erhöhen und damit Depolarisierungsvorgänge begünstigen.

Zusammenfassung.

1. Nach einer Vorbehandlung von Meerschweinchen und Katzen mit Aconitin bis zur Entstehung von ventrikulären Extrasystolen und nach einer Wartezeit bis zur Wiederherstellung einer supraventrikulären Reizbildung (Sinus oder Knoten) fanden wir eine Überempfindlichkeit gegen g-Strophanthin und k-Strophanthidin. Diese äußerte sich im Auftreten frequenter ventrikulärer Extrasystolen nach Gabe sehr niedriger Dosen (ab 2% der LD). Sie traten 10—20 sec nach der Injektion auf und klangen im allgemeinen bis maximal 4 min wieder ab.

2. Zwischen g-Strophanthin und k-Strophanthidin sahen wir keinen grundsätzlichen Unterschied, außer daß letzteres stärker wirksam war. Die Überempfindlichkeit hielt bis 4 Std nach Aconitin mit einer gewissen Schwankung an.

3. An vagotomierten Tieren waren diese Wirkungen nicht verändert, so daß die Bedeutung kardiokardialer Reflexe beim Zustandekommen der Strophanthinüberempfindlichkeit ausgeschlossen werden konnte. Lediglich die Dauer der Aconitineigenwirkung war unter Vagotomie verkürzt.

4. Nach einer Vorbehandlung der Tiere mit Digitoxin und g-Strophanthin im therapeutischen Dosisbereich war der Ablauf der Aconitinvergiftung nicht verändert. Auch zeigte sich durch diese Vorbehandlung die Aconitinsensibilisierung für nachfolgende Strophanthidininjektionen nicht beeinflußt. Somit handelt es sich nicht um eine wechselseitige Sensibilisierung.

5. Im Zustand der Sensibilisierung ließen sich auch mit Sympatol und Hypophysin tertiäre Reizbildungssteigerungen erzielen. Dagegen erwies sich Digitoxin als nicht gleichartig wirksam.

6. Am isolierten Froschherzen nach STRAUB konnten nach Aconitinvorbehandlung Frequenzsteigerungen durch Strophanthin hervorgerufen werden. Digitoxin zeigte sich auch hier nicht gleichartig wirksam.

7. Die möglichen Ursachen beim Zustandekommen des Phänomens werden diskutiert und mit analogen Erscheinungen der Strophanthinüberempfindlichkeit schwer geschädigter Herzen in der Klinik in Beziehung gesetzt.

Literatur.

ADRIAN, E. D.: J. of Physiol. **54**, 1 (1920); **55**, 193 (1921). — AMMANN, A., u. A. JARISCH: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **201**, 46 (1943). — BACQ u. Mitarb.: siehe GOFFART, M., u. Z. M. BACQ. Erg. Physiol. **47**, 553 (1952); u. VANREMOORTERE, E., M. GOFFART u. Z. M. BACQ, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 31 (1950). — BUSSE, W., u. S. J. LOENNECKEN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 232 (1953). — DAWES, G. S.: Pharmacol. Rev. **4**, 43 (1952). — EDENS, E.: Die Digitalisbehandlung. Berlin-München: Urban u. Schwarzenberg 1948. — FISCHER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **130**, 111 (1928). — FRAENKEL, A.: Strophanthintherapie. Berlin: Springer 1933. — GEILENKIRCHEN, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **198**, 152 (1941). — GOLDENBERG, M., u. C. J. ROTHBERGER: Pflügers Arch. **238**, 137 (1937); **239**, 156 (1938). — HAARMANN, W., A. HAGEMEIERS u. L. LENDLE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **194**, 205 (1940). — HARTUNG, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **66**, 1 (1911). — HOEKSTRA, R. A., u. A. SCHLEUSING: Z. exper. Med. **90**, 36 (1933). — HOFF, H. E., u. L. H. HAHM: Amer. J. Physiol. **124**, 591 (1938). — HOFFMANN, G., u. L. LENDLE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 376 (1951). — HOTTINGER, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **105**, 1 (1925). — v. HUEBER, E. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **187**, 541 (1937). — v. HUEBER, E. F., u. D. LEHR: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **189**, 25 (1938). — ISHIHARA, M., u. E. P. PICK: J. of Pharmacol. **29**, 355 (1926). — LENDLE, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **182**, 72 (1936). — LEVINE, S. A.: Amer. Heart J. **3**, 177 (1927). — LEVINE, S. A., u. T. D. CUNNINGHAM: Arch. Int. Med. **26**, 293 (1920). — LEVY, A. G.: J. of Physiol. **42**, 111 (1911). — Heart **4**, 319 (1913). — MOLL, A.: Ärztl. Forsch. **7**, 137 (1952). — MUNCH, J. C., u. J. B. WOLFFE: J. of Pharmacol. **45**, 269 (1932). — ROTHBERGER, C. J., u. L. ZWILLINGER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **181**, 301 (1937). — ROTHBERGER, C. J., u. H. WINTERBERG: Pflügers Arch. **150**, 217 (1913). — ROTHSCHUH, K. E.: Elektrophysiologie d. Herzens. Darmstadt: Steinkopff 1952. — Pflügers Arch. **249**, 339 (1947). — SCHERF, D.: Z. exper. Med. **51**, 816 (1926); **58**, 221 (1927); (1) **65**, 255 (1929); (2) **65**, 198 (1929). — Wien. Klin. Wschr. **1928**, II, 1769. — SCHLEUSING, A.: Diss. Leipzig 1933, zit. nach A. MOLL. — SEEGER, M. (1): Mém. Acad. roy. Méd. Belg. **1**, 1, (1941); zit. nach G. S. DAVES. — (2) Acta biolog. Belg. **1**, 341 (1941). — SOLLMANN, T.: A Manual of Pharmacology. Philadelphia u. London: W. B. Saunders Co. 1948. — STRASSER, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **136**, 101 (1928). — TRAUTWEIN, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 155 (1950). — WALTHER, R.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **195**, 709 (1940); (2) **196**, 202 (1940); **198**, 543 (1941); **201**, 611 (1943). — WASTL, H.: Z. Biol. **75**, 289 (1922). — WOOLLARD, H. H.: J. of Anat. **60**, 345 (1926).

Dr. H. GÖING, Göttingen, Pharm. Inst. d. Univ.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. LENDLE).

Pharmakologische Beeinflussung der tertiären Reizbildung bei Überempfindlichkeit des Herzens gegen k-Strophanthidin nach Vorbehandlung mit Aconitin.

Von

W. BUSSE und H. GÖING.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1954.)

In der vorausgehenden Arbeit hatte sich gezeigt, daß nach Abklingen der extrasystolischen Wirkung des Aconitins am Herzen eine erhöhte Bereitschaft besteht, auf geringe Dosen g-Strophanthin bzw. k-Strophanthidin (1—5% der LD nach HATCHER) mit ventrikulärer Extrasystolie zu reagieren. Diese Befunde wurden von uns im Sinne einer Sensibilisierung tertiärer Reizbildungszentren gedeutet. Zum Verständnis der Reaktionsbereitschaft war die Überlegung wichtig, daß noch im Herzen verbliebenes Aconitin hierfür kaum maßgeblich verantwortlich sein kann. Wir diskutierten die Möglichkeit, die gefundene pathologische Reaktionsbereitschaft mit dem klinischen Begriff der „Strophanthin-Überempfindlichkeit“ in Parallele zu setzen. Die folgenden Untersuchungen zielen nunmehr vorwiegend auf Möglichkeiten der antagonistischen Beeinflussung dieser pathologischen Reaktionsbereitschaft.

Der Wert antifibrillär wirksamer Substanzen, als deren klassische Vertreter Chinin und Chinidin bekannt sind, wurde auf die Eigenschaft zurückgeführt, die Refraktärphase zu verlängern (BIJLSMA u. VAN DONGEN). Unter dieser Betrachtungsweise bleibt vorerst der ursächliche Mechanismus unberücksichtigt, der den verschiedenen Stoffen antifibrilläre Wirkungen verleiht (primäre Stoffwechselbeeinflussung, primäre Membranwirkung?). Es führt jedoch zu einer falschen Vorstellung, wenn man die Verlängerung der Refraktärphase allein für antifibrilläre Eigenschaften verantwortlich macht. Dies wird deutlich am Beispiel des Acetylcholins, das bei einer Verkürzung der Refraktärphase gleichzeitig Hemmwirkungen auf die autonome Reizbildung der Kammer ausüben soll (ECKEY). Eine Verzögerung der Leitungsgeschwindigkeit, wie unter Chinin, zeigt sich in gleicher Weise auch bei Spontaninsuffizienz und unter Chloroformeinwirkung (TRAUTWEIN). Dabei ist für die letzten beiden Faktoren bekannt, daß sie zugleich eine extrasystolische Bereitschaft fördern. VAN DONGEN u. TAAL betonen hierzu, daß sich der Wert einer antifibrillären Eigenschaft nicht ohne weiteres aus der Beeinflussung der Refraktärzeit ablesen läßt.

Es schien uns daher sinnvoll, die festgestellte Überempfindlichkeit gegen Strophanthin und Strophanthidin auf ihre antagonistische Beeinflußbarkeit zu prüfen. Dabei war allerdings kritisch zu erwägen, daß sich

die Wirkung eines antagonistischen Stoffes sowohl gegen den geschaffenen Zustand der Überempfindlichkeit als auch die Strophanthidinwirkung selbst richten könnte. Ferner dürften aus diesen Versuchen weitere Schlüsse über die Natur dieser Strophanthidinwirkung zu ziehen sein, die wir bereits als Ausdruck von Wirkungen auf den Polarisationszustand der Membranen während der „Membranphase“ [FISCHER, 1928 (1)] diskutiert hatten.

Es mußte zunächst der Einfluß der antagonistischen Stoffe auf die Aconitineigenwirkung geprüft werden. Nach Abklingen des Aconitin-effekts wurden die gleichen Stoffe wiederum angewandt, um diesmal das Vorhandensein der Überempfindlichkeit gegen eine Strophanthidindosis zu testen. Folgende Stoffe wurden geprüft:

Procain (Novocain)
Procainamid (Novocainamid)
Chinin, hydrochlor.
Calciumchlorid
Kaliumchlorid
Acetylcholin
Doryl (Carbaminoylcholinchlorid)
Tetraäthylammonium
Pendiomid (N, N, N', N'-3-Pentamethyl-N-N'-diäthyl-
3-azapentylen-1,5-diammonium dibromid)
Hexamethonium.

Versuchsordnung.

Als Versuchstiere dienten 35 Katzen in Urethan-Narkose (1,5 g/kg i.m.). Alle Injektionen erfolgten in die Vena jugularis. Atmung durch Trachealkanüle. Mit 30–40 γ /kg (in einigen Fällen auch mehr) Aconitin i.v. wurde eine ventrikuläre Extrasystolie erzeugt. Die Tiere waren während dieser Zeit künstlich beatmet. Mit Hilfe der Aktionsstromkurve des Herzens (Siemens-Zweikoffergerät¹, 2. Ableitung) beurteilten wir die Herzfrequenz und die Entwicklung von Rhythmusstörungen. Nachdem eine supraventrikuläre Reizbildung die toxische Aconitinwirkung abgelöst hatte, fanden wir die bereits beschriebene Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber k-Strophanthidin. Dieses benutzten wir bei diesen Versuchen immer an Stelle von g-Strophanthin, weil es 1. sicherer wirksam ist und 2. wegen seiner raschen Elimination eine schnelle Injektionsfolge gestattet. Im übrigen sei auf unsere vorausgehende Arbeit verwiesen.

Zur Beurteilung antagonistischer Fähigkeiten verschiedener Stoffe gegenüber den experimentell gesetzten Rhythmusstörungen wurde herangezogen:

1. Wirkung auf die ventrikuläre Reizbildung unter Aconitin,
2. Verhütung des k-Strophanthidin-Effektes im Stadium der Sensibilisierung nach abgeklungener Aconitinwirkung. Die elektrokardiographische Registrierung, die Auswertung der Ergebnisse sowie die tabellarische Darstellung der Befunde wurden im wesentlichen in gleicher Weise wie in der vorausgehenden Arbeit vorgenommen. Es soll noch erwähnt werden, daß die Beurteilung der elektrischen Herzaktion allein aus nur einer Extremitätenableitung gewisse Schwierigkeiten bereiten kann, so daß wir nur eindeutige Befunde zur Auswertung heranzogen.

¹ Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Gerätes.

Versuchsergebnisse.

1. Novocain, Procainamid, Chinin.

Diese Stoffe werden in der Therapie der Rhythmusstörungen verbreitet angewandt. Das Novocain erschien für unsere Fragestellung besonders geeignet, nachdem WENDHUT bei Untersuchungen der Rheobase und Chronaxie am Froschventrikel unter Novocain eine deutliche Verlängerung der Chronaxie bei unveränderter Rheobase gefunden hatte. Die angewandten Konzentrationen lagen dabei in einem Bereich (1:200 000 bis 1:50 000), in dem keine Kontraktilitätsbeeinflussung erfolgte. Außerdem ist bekannt, daß Novocain die Refraktärperiode nicht verlängert (siehe VAN DONGEN u. TAAL). FLECKENSTEIN erklärte die Novocainwirkung am Muskel über membranstabilisierende Eigenschaften.

Wir benutzten Novocain in der Dosierung von 5–10 mg/kg (siehe Tab. 1). Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß 10 mg/kg die Aconitineigenwirkung in einem Normalrhythmus zu transformieren vermögen (Abb. 1). Die regularisierende Wirkung war im allgemeinen nach 25 min wieder abgeklungen. Wir bestätigten hiermit TRIPOD, der gleiches bereits am LANGENDORFF-Herz gefunden hatte. Die von uns als Test zum Nachweis der Sensibilisierung gewählte Dosis von 5% LD k-Strophanthidin ließ sich dagegen in ihrer Wirkung in keinem Falle aufheben oder abschwächen. Es kam sofort zu einer frequenten ventrikulären Extrasystolie über 2–3 min. Also erwies sich Novocain unwirksam gegen die Eigenwirkung des Strophanthidins und ihre Sensibilisierung durch Aconitin.



Abb. 1. Novocain. Katze 2300 g, künstliche Beatmung, EKG Extremitätenableitung II. a Regelmäßiger SR, Frequenz 162 min; b nach 30 µ/kg Aconitin VES 182 min; c Novocain: 6 min nach Aconitin 10 mg/kg Novocain intravenös, 1 min danach SR 150 min, der bei mäßig weiterer Frequenzabnahme 20 min anhält; d (31 min nach Aconitin) danach kommen Extrasystolen wieder zum Vorschein, Frequenz 137 min; e Novocain: idem, SR 137/min; f k-Strophanthidin: 5% LD intravenös, 15 sec nach Strophanthidin VES 178/min, Dauer der VES 1,5 min (42 min nach Aconitin).

Dem Procainamid werden gleichfalls antifibrilläre Eigenschaften zugeschrieben. STEARNS, CALLEHAN u. ELLIS fanden eine gute Wirksamkeit gegen Digitalisextrasystolen beim Menschen. Auch gegen das Cyclopropan-Adrenalinflimmern wird es als wirksam angegeben (MARK u. Mitarbeiter). GOLDBERG u. COTTEN prüften es experimentell gegen eine ventrikuläre Tachykardie durch Ouabain und Digitoxin an

Tabelle 1. *Antagonistische Versuche mit Novocain, Novocainamid und Chinin.*

Beeinflussung der Aconiteingewirkung										Wirkung auf die Strophanthidin-extrastolle durch 5% LD nach Aconitin			
Katze Nr.	Gewicht in g	Aconitin γ/kg	min nach Aconitin	Antagonist	Rhythmus und Frequenz			Zeit	nachher	min nach Aconitin	Rhythmus und Frequenz		
					vorher						vor Stroph.	nach Stroph.	
1	2330	30	24	Novocain	5 mg/kg	VES 272	1 min VES 239 4 min VES 240 5 min VES 220						
2	2068	35	20	Novocain	10 mg/kg	VES 240	0,5 min VES 190 3 min KR 166 7 min KR 160						
3	2300	30	5	Novocain	10 mg/kg	VES 182	0,5 min VES 150 11 min SR 113 28 min VES 115						
			30	Novocain	10 mg/kg	VES 123	1 min SR 136			42	SR 124	VES 180	
			60	Novocain	10 mg/kg	VES 163	7 min SR 126			56	SR 120	VES 172	
										70	SR 149	VES 228	
										89	SR 150	VES 162	
4	2780	30	75	Novocain	10 mg/kg	SR 129	2 min SR 171 5 min SR 135			80	SR 135	VES 195	
5	1550	30	75	Novocainamid	10 mg/kg	VES 150	0,5 min VES 182 4 min VES 173			79	VES 173	VES 185	
6	2780	30	22	Novocainamid	10 mg/kg	VSE 146	1 min VES 240 4 min VES 156 10 min SR 120						
7	2420	30	60	Novocainamid	20 mg/kg	SR 209	5 min SR 154			32	SR 120	VES 240	
										65	SR 154	VES 172	

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Beeinflussung der Aconitineigenwirkung					Wirkung auf die Strophanthidin-extrasystolie durch 5% LD nach Aconitin				
Katze Nr.	Gewicht in g	Aconitin γ/kg	min nach Aconitin	Antagonist	Rhythmus und Frequenz			Rhythmus und Frequenz	
					vorher	Zeit	nachher	min nach Aconitin	vor Strophanth. nach Strophanth.
8	1700	30	48	Novocainamid 20 mg/kg	Big 256	1 min VES 268 25 min VES 252	77 87	Big 252 KR 240	VES 277 VES 251
9	4260	45	185	Novocainamid 30 mg/kg	VES 172	1 min VES 150 2 min VES 180 13 min VES 150			
10	2010	30	83	Chinin 5 mg/kg	KR 182	1 min KR 215 2 min KR 213 10 min SR 190			
11	1600	30	141	Chinin 7 mg/kg	KR 183	1 min KR 183 3 min KR 180	93 118 144	SR 190 K. Big 150 KR 146	VES 150+190 K. Big 148 VES 218
12	2780	30	51	Chinin 10 mg/kg	KR 117	1 min VES 120 4 min VES 148 9 min VES 126 1 min VES 100	146	KR 180	VES 160
		30	99	Chinin 10 mg/kg	VES 100		62 109	VES 126 VES 100	VES 200 VES 166

Anmerkung: Die Differenzen der beiden Spalten „Minuten nach Aconitin“ ergeben die Zeit der k-Strophanthidininjektion nach Novocain-, Novocainamid- bzw. Chinin-gabe. Die extrasystolische Wirkung des Strophanthidins klang in allen Fällen 2–5 min nach der Injektion wieder ab. Die Frequenz ist angegeben in Schlägen/Minute. Unwesentliche Zwischenwerte von Rhythmus und Frequenz sind in der Tabelle fortgelassen.

Abkürzungen: SR Sinusrhythmus; KR Knotenrhythmus; Big Bigeminus mit AV-Knoten und Kammer als Reizbildungsstelle; VES Ventrikuläre Extrasystolie.

Hunden. Sie stellten fest, daß es den Sinusrhythmus gelegentlich kurzfristig wieder herstellen konnte. Die letale Infusionsdosis für Ouabain wurde durch Procainamid an Katzen aber nicht erhöht. Gelegentlich kam es nach Procainamid sogar zu Herzstillständen, die sie einer additiven Vergiftung zuschreiben. CHARLIER u. KLUTZ berichten, daß ventrikuläre Tachykardien nach Aconitin-Applikation auf das Epikard durch Procainamid für einige Sekunden in einen Sinusrhythmus überführt werden. WEDD u. Mitarbeiter prüften elektrophysiologische Eigenschaften am Schildkrötenherzstreifen unter rhythmischer elektrischer Reizung. Die Reizschwelle war bei einer Konzentration von 1:10000—1:50000 erhöht, die Geschwindigkeit der Erregungsleitung verlangsamt, während Kontraktilität, Rhythmik und Refraktärperiode unbeeinflusst blieben.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, erwies sich unter unseren Versuchsbedingungen Procainamid¹ in der Dosierung von 10—30 mg/kg im Sinne einer Regularisierung der Aconitinwirkung kaum wirksam. Der extrasystolische Ausgangsrhythmus blieb bis zu 5 min mit einer nicht einheitlichen Frequenzbeeinflussung (Steigerungen und Senkungen kamen vor) bestehen. Ebenso wenig erhielten wir Effekte im Sinne einer Verhütung der Strophanthidinwirkung. Sowohl bei normalem Ausgangsrhythmus als auch unter einer extrasystolischen Reizbildung trat die für Strophanthidin typische Erregung der tertiären Reizbildung zutage. Da die extrasystolische Reizbildung bei einer höheren Procainamid-Dosierung verstärkt war, gingen wir über die Dosierung von 30 mg/kg nicht hinaus. Unter den von uns gewählten Bedingungen läßt sich also im Gegensatz zu den vorher zitierten Befunden dem Procainamid keine wesentliche antifibrilläre Eigenschaft zuschreiben.

Chinin gehört bekanntlich zu den wirksamsten Stoffen gegen experimentelles Kammerflimmern. WEGRIA u. WIGGERS, WEGRIA u. NICKERSON sowie MELBOOM gaben Chinidin bzw. Chinin ab 1:500000 bzw. 1:100000 als wirksam an. WENDHUT u. LENDLE sahen ab 2×10^{-5} eine deutliche Chronaxieverlängerung, eine Vergrößerung der Rheobase lediglich ab 10^{-5} . Chronaxieverlängerungen sollen auch nach v. WERZ sowie LAPIQUE u. FRÉDÉRICQ erst in hohen Konzentrationen hervorgerufen werden, die allerdings therapeutisch nicht mehr zur Anwendung gelangen können.

Chinin hydrochlor. wurde in der Dosierung von 5—10 mg/kg intravenös unter den üblichen Bedingungen geprüft (Tab. 1). Chinin rief keine regularisierende Wirkung auf die Aconitin-Extrasystolie hervor (3 Versuche, nicht in der Tabelle aufgeführt). Nach Abklingen der Aconitinwirkung kam es durch Chinin gelegentlich sogar zu einer geringen Erhöhung der Frequenz (Nr. 10) und zu ventrikulären Extrasystolen (Nr. 12 und Abb. 2). Es finden sich ferner in der Tabelle Beispiele dafür, daß die Frequenz einer bestehenden Extrasystolie auch nach vorheriger Chinin-gabe durch Strophanthidin erhöht werden konnte. War dagegen die Aconitinwirkung abgeklungen und bestand eine supraventrikuläre Reizbildung, so kam es zwar auch nach Strophanthidin zu einer Extrasystolie,

¹ Novocainamid, Farbwerke Höchst, Verdünnung aus 10%iger Lösung der Originalampulle.

die aber, wie aus den angeführten Beispielen ersichtlich ist, nicht so frequent war, wie ohne Chininvorbehandlung (in einigen Fällen sogar Frequenzabnahme). Im Versuch 10 wurde die Empfindlichkeit gegen Strophanthidin geprüft, nachdem die Chiningabe etwa 60 min zurücklag, und es entstand nun eine erheblich höher frequente Extrasystolie. Somit erwies sich Chinin wie die vorigen Stoffe nicht als genügend prophylaktisch wirksam gegenüber der getesteten Strophanthidinextrasystolie nach Aconitin. Auffallend ist lediglich die Verhütung einer stärkeren Frequenzsteigerung unter gewissen Bedingungen.

2. Calcium und Kalium.

R. HÖBER hat dem Calcium eine spezifisch dichtende Wirkung auf Zellmembranen zugeschrieben. Es schien uns daher angebracht, Calcium in unsere Versuche einzubeziehen, vorallem, nachdem sich bereits beim Novocain, dem ebenfalls solche Eigenschaften zukommen, regularisierende Eigenschaften gegenüber der Aconitinwirkung gezeigt hatten.

RODECK konnte am Kaltblüterherzen für niedrige Calcium-Konzentrationen am EKG Effekte im Sinne einer Membrandichtung hervorrufen, bei Steigerung der Konzentration dagegen kam es zu Veränderungen, die er im Sinne einer Membranauflockerung durch Schädigung des Zellplasmas erklärte. In diesem Bereiche stellten sich nach einigen Minuten auch Kontraktionen und Herzstillstände ein. Ebenso beschrieben GOLDENBERG u. ROTHBERGER ein Aussetzen der Automatie des isolierten Purkinjefadens nach stärkerer Erhöhung der Calcium-Konzentration. ROTHSCUH beobachtete umgekehrt nach Calciumentzug eine erhöhte Erregbarkeit des Herz-

streifenpräparates (Frosch) auf geringe Steigerung der Kalium-Konzentration in der Nährlösung. Diesen Ergebnissen entspricht auch der Befund von AMANN u. JARISCH, da sich am Ganztier die Aconitinwirkung mit calciumfallenden Stoffen verstärken läßt. Somit ergibt sich zugleich ein weiterer Gesichtspunkt für die Anwendung von Calcium in unserer Versuchsreihe. Da bekanntlich Aconitin

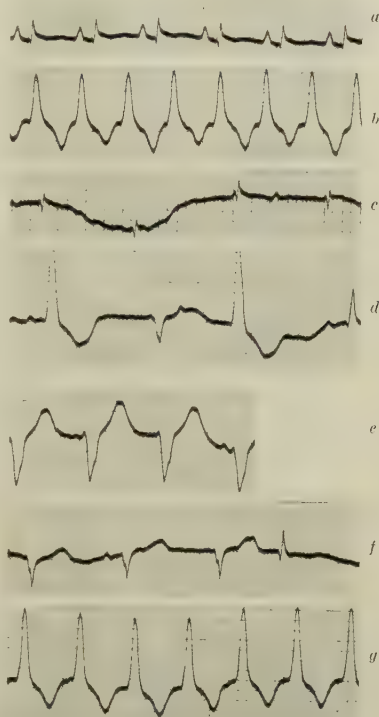


Abb. 2. *Chinin*. Katze 2780 g, künstliche Beatmung, EKG Extremitätenableitung II. *a* Regelmäßiger SR, Frequenz 176/min; *b* nach 30 μ /kg Aconitin VES 240/min; *c* 51 min nach Aconitin KR 117/min; *d e f* Chinin: (10 mg/kg) 1,4 bzw. 9 min nach der Chiningabe Entwicklung von VES, Frequenz bei *e* 148/min (führendes Reizbildungszentrum bei *f* aus einer Ableitung nicht mit Sicherheit zu bestimmen, Frequenz 126/min); *g* Strophanthidin: 15 sec nach 5% LD (11 min nach Chinin) VES, Frequenz 200/min.

Tabelle 2. *Antagonistische Versuche mit Calcium.*

Beeinflussung der Aconitineigenwirkung					Wirkung auf die Strophanthidinextrastolie nach Aconitin							
Katze Nr.	Gewicht g	Aconitin γ/kg	min nach Aconitin	Calcium mg/kg	Rhythmus und Frequenz			min nach Aconitin	k-Stro- phan- thidin % d. LD	Rhythmus und Frequenz		Bemerkungen
					vorher	Zeit	nachher			vor Stroph.	nach Stroph.	
1	2250	—	—	50	SR 200	2 min	SR 220					Tiervagotomiert
2	1780	—	—	25	SR 110	2 min	SR 108	72	5	SR 228	SR 240	
		40	70	20	SR 223	2 min	SR 228	84	5	SR 228	SR 240	
3	2800	30	49	25	VES 240 ¹	0,5 min	VES 124	94	5	SR 228	VES 218	¹ Ausgangsfre- quenz war 1 min nach KCl-Gabe, vorher KR 114
						1 min	SR 109	52	5	SR 109	KR 97	
								67	5	SR 116	VES 124	
4	2600	30	136	25	SR 136	2 min	SR 150	138	5	SR 150	SR 150	
						15 min	SR 150	151	5	SR 150	SR 127	
						25 min	SR 136	161	5	SR 136	VES 180	
5	1550	40	9	25	VES 164	1 min	VES 128					¹ VES halten bis 10 min nach Strophanthidin an
						2 min	KR 100					
						6 min	VES 144					
						17 min	SR 121					
			26	50	SR 121	0,5 min	VES 116	27	10	VES 116	VES 133	
						1 min	VES 116					
6	1610	30	9	50	VES 240	0,25 min	SR 133	32	5	SR 156	VES 300 ¹	
						11 min	SR 154					
7	2250	35	10	50	VES 240	0,3 min	VES 150					¹ kein EKG ge- schrieben, nur beobachtet
						3 min	VES 142	88	5	SR 179	KR 160	
			85	30	SR 150	9 min	VES 144	100	5	SR 180	unverändert ¹	
						1 min	SR 179	110	4	SR 182	VES 176	

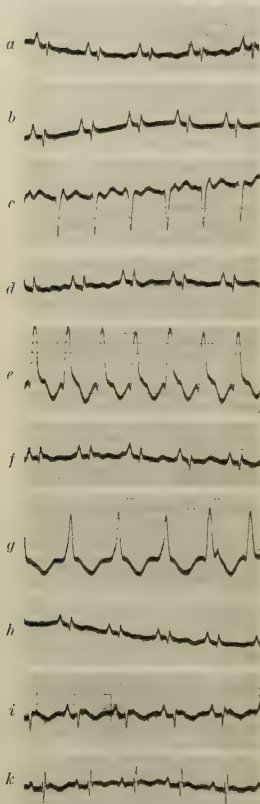
zur Gruppe der „Kaliumsensibilisatoren“ (BACQ) gehört, könnte das Calcium als der natürliche Antagonist aufgefaßt werden. VANREMORTEERE diskutierte in diesem Zusammenhang den Mechanismus der Kalium-Desensibilisierung auch über eine Membranwirkung, wie sie für Novocain, gewisse Antihistamine und auch Calcium bekannt ist.

In der Tab. 2 finden sich die Versuche mit Calciumchlorid. Zunächst prüften wir dessen Wirkung an nichtvorbehandelten Tieren (Nr. 1 u. 2). Es ergab sich, daß Calciumchlorid in der Dosierung von 25—30 mg/kg intravenös keinen wesentlichen Einfluß auf die normale Reizbildung und die Herzfrequenz ausübte. Aus den Versuchen Nr. 3, 5 und 6 ist ersichtlich, daß es die ventrikulären Extrasystolen bei ausgeprägter Aconitinwirkung in einen supraventrikulären Rhythmus zu transformieren vermochte. Nicht immer kam es zu einem Sinusrhythmus, jedoch zeigte sich, daß die durch Aconitin stimulierte tertiäre Reizbildung gehemmt worden war. Zugleich wurde die Herzfrequenz gesenkt. Der Wirkungseintritt war verschieden schnell. In den meisten Fällen zeigte sich der Erfolg schon vor Ablauf 1 min, in anderen Fällen kam es unter Frequenzabnahme zu mehrmaligem Wechsel der Rhythmen. Eine Dosierung von 50 mg/kg rief dagegen selbst ventrikuläre Rhythmusstörungen hervor (Nr. 5 und 7) oder aber ließ eine vorhandene bestehen. Diese war in den meisten Fällen jedoch nicht so frequent wie vorher unter Aconitin. Mit einer Dosis von 25 mg/kg wurden diese extrasystolischen Wirkungen nicht beobachtet.

Danach testeten wir die Empfindlichkeit des Herzens gegen k-Strophanthidin in der üblichen Dosierung von 5% LD, unter der es regelmäßig zu einer frequenten ventrikulären Reizbildung gekommen war. Dieser Effekt wurde durch Calciumvorgabe verhütet, wie aus den Versuchen Nr. 2, 3, 4 und 7 und Abb. 3 ersichtlich ist. Ohne wesentliche Frequenzbeeinflussung bleibt nach der Strophanthidininjektion die supraventrikuläre Reizbildung führend. Die Reversibilität dieses Schutzeffektes ließ die Calciumwirkung besonders deutlich hervortreten. Die Versuche Nr. 3, 4, 6 und 7 zeigen Ergebnisse, bei denen unter Abklingen der Calciumwirkung nach 18 und mehr Minuten die pathologische Reaktionsbereitschaft des Herzens gegen Strophanthidin wiederkehrt. In Versuch Nr. 5 wurde eine Testinjektion durchgeführt, nachdem durch 50 mg/kg Calciumchlorid ein ventrikulärer Rhythmus erzeugt worden war (Überdosierung). Die ventrikuläre Reizbildung blieb in diesem Falle bestehen, ohne daß es aber zu einer stärkeren Frequenzsteigerung kam. Auch aus den Versuchen nach Abklingen der Calciumschutzwirkung läßt sich der Eindruck gewinnen, daß zwar eine ventrikuläre Reizbildung wieder zum Vorschein kommt, diese dann aber nicht so frequent ist, wie unter gleichen Bedingungen ohne Calciumvorgabe.

Bekanntlich wird durch eine mäßige Kaliumvermehrung die Labilität der Reizbildungszentren erhöht und damit ihre Frequenz beschleunigt. Stärkere Konzen-

trationen wirken lähmend auf die supraventrikuläre und ventrikuläre Reizbildung durch stärkere Depolarisierung [KISCH 1926 (1 u. 2)]. SCHERF konnte nach unterschiedlicher Aconitinindosierung durch i.v. gegebenes Kaliumchlorid extrasystolische Rhythmen erzeugen. Kaliumchlorid ruft aber ohne Vorbehandlung keine gleichen Veränderungen hervor wie Aconitin (ROTHSCHUH 1952, WINLER, HAFF u. SMITH). Die Frage nach den Ursachen für den Zustand der Überempfindlichkeit des Herzens nach Abklingen der Aconitinwirkung wurde in der vorangehenden Arbeit diskutiert. Es wurde in diesem Zusammenhang erwähnt, daß möglicherweise noch im Herzen verbliebenes Aconitin nicht für den geschaffenen Zustand selbst als ursächlich zu veranschlagen sei. Es ließen sich gewisse Parallelen zwischen dem am Herzen geschaffenen Zustand und bestimmten in der menschlichen Herzpathologie bekannten Zuständen aufzeichnen, soweit für letztere ebenfalls die Bereitschaft, mit ventrikulären Extrasystolen zu reagieren, charakteristisch ist. Zur weiteren Klärung im Rahmen unserer Versuchsanordnung lag es daher nahe, auch der Kaliumwirkung Aufmerksamkeit zu schenken.



In Vorversuchen zeigte sich, daß Kaliumchlorid in der Dosierung von 10 mg/kg ohne Aconitinvorbehandlung keinen Einfluß auf Frequenz und Reizbildung am Herzen hatte. 20 mg/kg Kaliumchlorid führte in einem Falle zur Transformation eines Sinusrhythmus in einen Knotenrhythmus. Bei intravenösen Gaben von 50 mg/kg Kaliumchlorid kam es über einen mäßig frequenten extrasystolischen Rhythmus unter gleichzeitiger Frequenzabnahme in 3 min zum Herzstillstand. Nach vorausgegangener Aconitingabe und Abklingen der Wirkung ist die Empfindlichkeit gegenüber Kalium deutlich erhöht. Wie aus Tab. 3 und Abb. 3 hervorgeht, ruft Kaliumchlorid in der Dosierung von 10 mg/kg eine dem Strophanthin im Stadium der Überempfindlichkeit ähnliche Wirkung hervor.

Innerhalb von 10–20 sec traten frequente ventrikuläre Extrasystolen auf, die bis maximal 4 min wieder abgeklungen waren. In einem Falle prüften wir die Dauer der Kaliumüberempfindlichkeit und fanden sie noch 332 min nach Aconitingabe unabgeschwächt

Abb. 3. Wirkung von Strophanthidin, Kalium und Calcium. Versuchstier Katze, 1780 g, künstliche Beatmung, EKG Extremitätenableitung II. *a* Regelmäßiger SR, Frequenz 218/min; *b* nach cervical Vagotomie, SR 226/min; *c* nach Aconitin, Frequenz 300/min; *d* 31–41 min nach Aconitin besteht ein regelmäßiger SR, Frequenz um 223/min; *e* k-Strophanthidin: 15 sec nach der Injektion von 5% LD intravenös, VES 327, Dauer der Wirkung 2,5 min; *f* nach Abklingen der Strophanthidinwirkung regelmäßiger SR um 224/min; *g* Kaliumchlorid: 51 min nach Aconitin 10 mg/kg KCl intravenös, 15 sec danach VES 248/min, Dauer 3 min; *h* nach Abklingen der KCl-Wirkung regelmäßiger SR 223/min; *i* Calciumchlorid: 70 min nach Aconitin 20 mg/kg intravenös, 2 min danach regelmäßiger SR 228/min; *k* Strophanthidin: 15 sec bis 4 min nach Strophanthidin (5% LD) unverändert regelmäßiger SR, Frequenz bis maximal 240 min. Weitere Testung mit Strophanthidin intravenös und Abklingen der Ca.-Wirkung siehe Tab. 2, Versuch 2.

vorhanden (Nr. 2 Tab. 3). Weiterhin zeigt Versuch 5 der Tab. 3, daß sich durch Calciumentzug die gleiche Wirkung auf die tertiäre Reizbildung hervorrufen läßt. Es wurde hier Natriumcitrat in der Dosierung von 67 mg/kg i.v. gegeben. Ohne Vorbehandlung war eine gleich große Natriumcitratmenge unwirksam.

Kaliumgabe und Calciumentzug waren also im gleichen Sinne wirksam. Bei Steigerung der Kaliumchloriddosis bis 50 mg/kg kam es über eine Phase ventrikulärer Extrasystolen zu einem Herzstillstand innerhalb von 20 sec.

Tabelle 3. *Kaliumwirkung nach abgeklungenen Aconitinextrasystolen.*

Katze Nr.	Gewicht g	Aconitin kg	Zeit nach Aconitin- gabe / min	Kalium mg/kg	Rhythmus und Frequenz		Dauer der Wirkung min
					vor Kalium	nach Kalium	
1	2800	30	50	10	KR 111	VES 253	4
2	2600	30	332	10	SR 150	VES 188	2
3 ¹	1786	30	51	10	SR 218	VES 240	3
4	2780	30	63	10	SR 114	VES 360	3
5	1610	30	66	67 mg/kg Na-Citrat	KR 114	VES 285	4

¹ Tier vagotomiert, Sinus-Rhythmus schon nach 20 min.

3. Acetylcholin und Doryl.

Bekanntlich wirkt Acetylcholin (als Überträgerstoff des Herzvagus) hemmend auf die Reizbildung des Sinus. Wir gingen daher von der Fragestellung aus, ob Acetylcholin, intravenös gegeben, auch die in unseren Versuchen stimulierte Reizbildung in der Kammer hemmt.

Nach Untersuchungen von WOOLLARD wird die Herzkammer des Warmblüters nicht von Vagusfasern versorgt. Zusammenfassend berichtete kürzlich ROTHSCUH (1954) über die Rolle des Acetylcholins im Herzen und legte dar, daß auch ohne Vaguseinfluß jede normale Aktion der Herzmuskelfaser mit einer Acetylcholinbildung verbunden ist. Ihr Gehalt an Proacetylcholin, Acetylcholin, Cholinesterase und Acetylase seien Faktoren, die für die jeweilige Reaktionsbereitschaft des Herzens verantwortlich sind. Ob die Minderung der Erregbarkeit und damit der Frequenz nach Acetylcholin auf einer erhöhten oder herabgesetzten Polarisierung beruht, kann auf Grund unterschiedlicher Befunde nicht mit Sicherheit entschieden werden. Nach Untersuchungen von HOLLAND, DUNN u. GREIG am isolierten Kaninchenvorhof besteht eine erhöhte Kalium-Natrium-Permeabilität unter Acetylcholin, wobei sich Natrium und Kalium in jeweils äquimolaren Mengen ersetzen. Am isolierten Froschstreifenpräparat fanden ROTHSCUH u. BAMMER unter Acetylcholin 10^{-3} bis 10^{-6} und weniger starken Konzentrationen 10^{-6} bis 10^{-9} an Stelle einer erwarteten Verlangsamung der Erregungsleitung eine Beschleunigung. Sie führten die unterschiedlichen Acetylcholinwirkungen am Herzen auf den verschiedenen Zustand des oben angeführten „Acetylcholin-Systems“ zurück. FRÖHLICHER sah bei elektrisch ausgelöstem Kammerflimmern an isolierten Hunde- und Kaninchenherzen nach 1–5 mg Acetylcholin für die Dauer von 5–120 sec totale Herzstillstände, denen meistens eine normale Herztätigkeit folgte. Somit erschien es wertvoll zu untersuchen, ob auch Acetylcholin bzw. Doryl unter unseren Versuchsbedingungen eine hemmende Wirkung auf die Stimulierung tertiärer Zentren auszuüben vermag.

Tabelle 4. *Antagonistische Versuche mit Acetylcholin und Doryl.*

Katze Nr.	Beeinflussung der Aconiteigenwirkung					Wirkungen auf die Strophanthidinextrastolie nach Aconitin		
	Ge- wicht g	Aconi- tin γ /kg	min nach Aconi- tin	Antagonist	Rhythmus und Frequenz		min nach Aconi- tin % LD	Rhythmus und Frequenz vor Stroph.
1	4260	45	2	Acetylcholin 5 γ /kg	VES 182	0,3 min SR 167 0,7 min SR 150 1 min KR 146 4 min VES 188 0,5 min SR 126 1,5 min KR 128 5 min VES 150		
					VES 137			
					KR 97	0,5 min KR 97	41	5
					VES 171 VES 128	1 min VES 137	62,5	5
					VES 284 VES 390	0,5 min VES 420 0,5 min SR 150 2 min VES 360		
2	1720	30	40	Acetylcholin 10 γ /kg	KR 156	0,5 min KR 150	35,5	5
					VES 185	0,5 min VES 228 2 min KR 204 3 min VES 210 1 min KR 148 0,5 min VES 180 2 min VES 200 0,3 min VES 143 1 min u. 138 2 min KR 156 2,5 min VES 221		
3	1350 1	40	13 18	Acetylcholin 10 γ /kg Acetylcholin 10 γ /kg	KR 139 VES 200	0,5 min VES 180 2 min VES 200 0,3 min VES 143 1 min u. 138 2 min KR 156 2,5 min VES 221	63	5
					VES 208			
4	1600	30	35	Acetylcholin 10 γ /kg	KR 150	0,5 min KR 150	35,5	5
5	2200	30	14	Acetylcholin 10 γ /kg	KR 148	0,5 min KR 148	63	5
					VES 240	0,5 min VES 240		

Beeinflussung der Aconitineigenwirkung					Wirkungen auf die Strophanthidinextrastolie nach Aconitin			
Katze Nr.	Ge- wicht g	Aconi- tin γ/kg	min nach Aconi- tin	Antagonist	Rhythmus und Frequenz		Rhythmus und Frequenz	
							vor Strophanth.	Zeit nach Strophanth.
6	2900	30	10	Acetylcholin 10 γ/kg	VES 180	1 min VES 198		
					VES 156	3 min VES 180		
						0,2 min KR 136		
						0,5 min VES 150		
						2 min SR 230		
7	1550	35	63	Acetylcholin 10 γ/kg	SR 240	3 min KR 130		
						1 min SR 120		
							SR 120	0,5 min VES 300
					SR 150	1 min SR 144	SR 120	1 min SR 240
					KR 150	1 min SR 135	SR 144	1 min SR 164
					VES 327	1 min VES 190	SR 135	0,2 min VES 330
						4 min VES 193		
						8 min VES 233		
						1,5 min VES 200		
						1 min VES 200	VES 200	1 min VES 210
8	2150	30	24	Doryl	VES 210	1 min VES 200	VES 200	0,5 min VES 340
					VES 232	1 min VES 200	VES 200	0,5 min VES 218
					VES 200	1 min VES 190	VES 190	1 min VES 192
							VES 194	1 min VES 210
					VES 120	1 min SR 126	SR 126	2 min VES 140
5	2200	30	90	Doryl	KR 154	1 min KR 100	KR 100	0,2 min VES 202
					VES 180	5 min VES 180	KR 118	0,2 min VES 260
					KR 140	1 min SR 130	VES 180	0,2 min VES 270
6	2900	30	72	Doryl			SR 156	0,2 min VES 238

Anmerkung: Uncharakteristische Zwischenwerte von Frequenz und Rhythmus sind aus der Tabelle fortgelassen. Abkürzungen siehe Tab. 1. ¹ Tier vagotomiert. ² 10 mg/kg KCl.

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, zeigte Acetylcholin ein sehr wechselndes Verhalten. Gegenüber der Eigenwirkung des Aconitins kamen neben unwesentlichen Frequenzänderungen stärkere Steigerungen (3, 5), wie auch deutliche Minderungen der extrasystolischen Frequenz (1, 2, 3, 5) vor. In einigen Versuchen (1, 3, 5, 6) war mit der Frequenzsenkung ein kurzfristiger Übergang in einen supraventrikulären Rhythmus zu verzeichnen

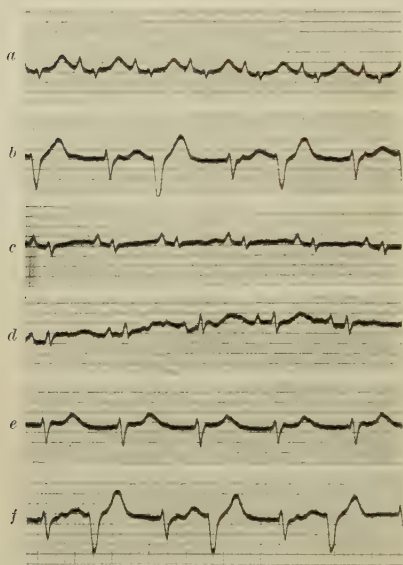


Abb. 4. *Acetylcholin*. Katze 4260 g, künstliche Beatmung, EKG Extremitätenableitung II. *a* Regelmäßiger SR, Frequenz 200/min; *b* nach Aconitininfusion (45 μ /kg in 40 min) VES (wahrscheinlich K. Big), Frequenz 182/min; *c d e* 20, 45 bzw. 90 sec nach 5 μ /kg Acetylcholin intravenös, *c d* regelmäßiger SR, Frequenz 167 bzw. 150/min, *e* KR 146/min; *f* Ausgangsrhythmus 4 min nach Acetylcholin, Frequenz 188/min.

nen (Abb. 4), während dies bei anderen Versuchen (sogar am gleichen Tier) nicht der Fall war. Die Frequenz der supraventrikulären Reizbildung nach abgeklungener Aconitinwirkung wurde durch Acetylcholin gesenkt (5, 6), was im Falle einer hohen Sinusfrequenz besonders ausgeprägt sein konnte. Oder sie blieb unbeeinflusst. In einem nicht aufgeführten Versuch rief Acetylcholin nach abgeklungener Aconitinwirkung einen frequenten ventrikulären Rhythmus hervor. Strophanthidin wurde entweder gleichzeitig (Versuche in der Tabelle nicht aufgeführt) oder bis 1½ min nach Acetylcholin intravenös gegeben. Eine sichere Verhütung der extrasystolischen Wirkung des Strophanthidins (5% LD) war nicht zu erzielen.

Doryl zeigte gegenüber der Aconitinwirkung eine mehr oder weniger ausgeprägte Minderung der extrasystolischen Frequenz, und nur in einem Falle (8) trat unter geringer

Frequenzzunahme ein Sinusrhythmus auf, wobei hier allerdings schon eine niedrige Ausgangsfrequenz bestanden hatte. Die Wirkung des Strophanthidins (nach abgeklungener oder nicht abgeklungener Aconitinwirkung) wurde durch Doryl nicht verhütet. Die Frequenzsteigerung nach Strophanthidin schien in einigen Versuchen nicht so ausgeprägt wie sonst (7, 8). Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß Acetylcholin und Doryl die Wirkung des k-Strophanthidins nicht verhindern konnten.

4. Ganglienblocker.

Es sollte hier durch Lähmung intrakardialer Ganglien sowie der Ganglien des peripheren Sympathicus die Rolle reflektorischer Vorgänge

am Zustandekommen der Strophanthidinwirkung untersucht werden. Wie bereits festgestellt wurde, war eine cervicale, bilaterale Vagotomie ohne Einfluß auf den Ablauf der Reaktion (Görsch u. Busse). Damit wurde aber nicht ausgeschlossen, daß sympathische Impulse über die Herznerven sowie reflektorische Vorgänge in der Peripherie von Bedeutung sein könnten. Versuche am isolierten Froschherzen machten dies zwar wenig wahrscheinlich; aber es schien uns dennoch angebracht, mit Ganglienblockern am Ganztier einen quantitativen Vergleich der Reaktionen zu erzielen. Den größten Teil der Versuche führten wir mit Tetraäthylammonium (TEA) durch. Vergleichsweise wurden in einigen Fällen auch Pendiomid und Hexamethonium (C_6) herangezogen.

TEA beeinflusst die Sinusfrequenz des Herzens im Sinne einer Beschleunigung oder Verlangsamung, je nach dem Vorherrschen eines Sympathico- oder Parasympathicotonus. Daneben soll es in großen Dosen direkte Wirkungen auf den Herzmuskel haben, an dem es die Produktion ektopischer Reize provozieren kann (ACHESON u. MOE, 1945, 1946). Diesem Befund entspricht auch, daß unter TEA die Dauer des Cyclopropan-Adrenalin-Flimmerns verlängert sein kann (STUTZMAN, PETTINGA, FRUGGIERO u. MAISON). MOE u. FREYBURGER schreiben diesen mangelnden Schutzeffekt nicht einer unvollständigen sympathischen Blockade zu.

Versuche (5 Katzen) mit 10 mg/kg TEA intravenös ließen zunächst erkennen, daß die Aconitinwirkung kurzfristig (1—2 min) verstärkt wurde, indem die Frequenz der Extrasystolen anstieg. In einzelnen Fällen, besonders bei schon nachlassender Aconitinwirkung, war dieser Effekt kaum vorhanden. War die extrasystolische Wirkung des Aconitins bereits durch eine supraventrikuläre Reizbildung abgelöst, so blieb diese nach TEA-Gabe mit kaum veränderter Frequenz bestehen. Ein Einfluß im verhütenden oder auch verstärkenden Sinne gegen die Strophanthidinwirkung nach Aconitinvorbehandlung war in unseren Versuchen nicht zu erkennen. In 2 Fällen wurden 2% LD Strophanthidin geprüft und als voll wirksam gefunden. Die Dauer der Strophanthidinwirkung war gegenüber den sonstigen Beobachtungen nicht verlängert. An 2 Tieren wurden zweifelhafte Ergebnisse insofern erzielt, als die Strophanthidintestungen im Bereiche der Abklingezeit der Sensibilisierung lagen und vorher eine cervicale bilaterale Vagotomie vorgenommen war. Hierbei mußte die Strophanthidindosis zur Erzielung der typischen Wirkung auf 10% der LD gesteigert werden. Diese Befunde sprechen insgesamt für eine Steigerung der Aconitineigenwirkung, während die Auswirkungen der Strophanthidininjektionen durch TEA unbeeinflusst blieben. Weiter wurden an je einer Katze orientierende Versuche mit Pendiomid (4 mg/kg) und C_6 (5 mg/kg) durchgeführt. Auch diese zeigten keine Verhütung der Strophanthidinwirkung. Gleichzeitig konnten durch die Versuche mit Ganglienblockern reflektorische Vorgänge über den peripheren Sympathicus am Zustandekommen der Strophanthidinwirkung weitgehend ausgeschlossen werden.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß außer Calciumchlorid keiner der von uns geprüften Stoffe in der Lage war, die durch k-Strophanthidin hervorgerufene ventrikuläre Extrasystolie nach abgeklungener Aconitinwirkung mit Sicherheit zu verhüten. Es wurde ferner gezeigt, daß Kaliumchlorid nach abgeklungener Aconitinwirkung ebensolche Effekte auf die tertiäre Reizbildung entfaltet wie Strophanthin oder Strophanthidin. Damit bieten sich Gesichtspunkte zur Deutung dieser Strophanthidinwirkung und der antagonistischen Fähigkeit des Calciums.

Ebenso wie der Zustand der Strophanthin- bzw. Strophanthidin-überempfindlichkeit noch über Stunden nachweisbar sein kann, hält diese Überempfindlichkeit auch gegenüber Kalium-Ionen annähernd gleiche Zeit an, wie orientierende Versuche ergeben haben. Auf Grund welcher näheren Bedingungen sich die beschriebene Reaktionsbereitschaft am Herzen aber über eine Zeit äußert, die die Eliminationszeit des Aconitins überschreitet, kann nicht endgültig entschieden werden. Möglicherweise hat die Aconitinelimination einen exponentiellen Charakter, so daß geringe im Herzen verbliebene Mengen für den Zustand verantwortlich sind. Dabei könnten auch verschiedene Angriffspunkte für die Eigenwirkung des Aconitins und für den Zustand der Überempfindlichkeit nach der Eigenwirkung bestehen. Auch am isolierten Organ läßt sich die Kaliumüberempfindlichkeit nicht sehr schnell wieder auswaschen. Ferner können Herzen, welche längere Zeit unter tachysystolischen Bedingungen (Aconitineigenwirkung) gearbeitet haben, Schädigungen erleiden, die zu der beschriebenen Überempfindlichkeit führen könnten.

Die Reaktion gegenüber Kalium-Ionen war in unseren Versuchen an einen plötzlichen Anstieg ihrer Blutkonzentration gebunden. Ohne eine Vorbehandlung mit Aconitin blieben Strophanthidin und Kalium wirkungslos, es sei denn, daß sie höher dosiert wurden. Die dann unter Kalium auftretende Extrasystolie war weniger frequent und ging unter weiterer Frequenzabnahme in einigen Minuten in einen Herzstillstand über. Es ließ sich mit solchen höheren Dosen von Kaliumchlorid nicht der gleiche Zustand erreichen wie mit Aconitin, worauf ROTHSCHEIDT (1952) sowie WINKLER u. Mitarb. hingewiesen hatten. Die Strophanthidinvergiftung allein unterschied sich von der Strophanthidingabe (5% LD) nach Aconitinvorbehandlung in der Art der Rhythmusstörungen nicht.

Intravenöse Zufuhr von Calciumchlorid zeigte einen zeitlich begrenzten Antagonismus gegenüber der Strophanthidin- und Kaliumwirkung. Der Zustand der Überempfindlichkeit am Herzen wurde dadurch nicht endgültig aufgehoben. Die Calciumschutzwirkung war nur etwa 15 min vorhanden. Diese Beobachtung der Calciumwirkung deutet auf einen Kaliumantagonismus. Calciumentzug zeigt die gleiche Wirkung wie Kaliumgabe und weist gleichfalls auf die Wichtigkeit des Kalium-Calcium-Verhältnisses hin.

Novocain vermochte dagegen nur die Eigenwirkung des Aconitins aufzuheben. Dieser Effekt läßt sich wahrscheinlich über seine membranstabilisierende Eigenschaft erklären. Die Strophanthinwirkung wurde dagegen durch Novocain nicht verhütet. Die zur Testung benutzte k-Strophanthindosis (5% LD = 18,5 γ /kg) war allerdings auf eine sichere extrasystolische Wirkung abgestimmt. Möglicherweise hätte sich auch hier ein Antagonismus geringeren Grades zeigen können, wenn gerade nur die jeweilige extrasystolische Grenzdosis von Strophanthin benutzt worden wäre.

O'BRIEN, ROCKEY, MURPHY u. MEEK konnten zeigen, daß durch Digitoxin und Digoxin die Schwelle für Rhythmusstörungen nach intravenösen Adrenalingaben erniedrigt wird. Aus ihren Versuchen an nichtnarkotisierten Hunden geht weiter hervor, daß 1 Std nach großer Glykosidgabe (3 mg/kg Digitoxin bzw. 15 mg/kg Digoxin) eine Erhöhung des Kaliumplasmaspiegels bestand. Unter Adrenalingaben kam es kurzfristig bei den digitalisvorbehandelten und den Kontrolltieren zu einem sofortigen steilen Kaliumanstieg im Plasma, der bei den vorbehandelten Tieren wegen der erhöhten Ausgangslage des Kaliumplasmaspiegels nach Überschreiten einer kritischen Schwelle zu extrasystolischen Rhythmen führte. Schon GINSBURG und CATTEL hatten die Erhöhung des Kaliumspiegels nach Digitalisierung beschrieben. Beim Menschen konnten DÖRRIE, GÖLTNER u. SCHWAB nach Strophanthin in therapeutischen Dosen eine Erhöhung des Kaliumplasmaspiegels bei gleichzeitiger Erniedrigung des Natriumspiegels nachweisen.

Diese Feststellungen zeigen vielleicht gewisse Erklärungsmöglichkeiten für die Extrasystolie nach Strophanthin über Ionenwirkungen an. Die „*kaliumartige*“ *Strophanthinwirkung im Stadium der Sensibilisierung* könnte vielleicht auf einer akuten Kaliumfreisetzung beruhen. Ihre Kurzfristigkeit wäre damit an die Wiederherstellung eines neuen Gleichgewichtes zwischen intra- und extracellulärem Kalium geknüpft (KÜHNS). Diese Vorgänge sind durch eine Erniedrigung der Schwelle für Kaliumwirkungen sichtbar gemacht, und sie decken sich zeitlich mit der ersten Phase der Glykosidbindung (nach FISCHER „Membranphase“). In ihrer Flüchtigkeit sind sie nicht der Ausdruck der eigentlichen „therapeutischen“ Digitaliswirkung. Für die therapeutische Digitaliswirkung besteht auch kein Calciumantagonismus, wie er hier festgestellt wurde, sondern ein Calciumsynergismus im Hinblick auf die positive Inotropie des Herzens.

Wie intravenöse Adrenalingaben nach Digitalisierung (O'BRIEN u. Mitarb.) heterotope Reizbildungen parallel zum Anstieg des Kaliumspiegels im Blut entstehen lassen, lassen sich auch gleiche Rhythmen in unseren Versuchen im Stadium der Sensibilisierung durch Sympatol und Strophanthin hervorrufen. Da aber sowohl Strophanthin als auch Digitoxin eine Erhöhung des Kaliumspiegels im Blut hervorrufen (DÖRRIE u. Mitarb., O'BRIEN u. Mitarb.) und da letzteres bei uns in entsprechender Dosierung keine Extrasystolie erzeugte, wäre vielleicht daran zu denken, daß der Geschwindigkeit der Glykosidwirkung bzw. der Steilheit des Kaliumanstiegs im Plasma eine Bedeutung zukommt.

Chinin und Procainamid, die in der Therapie gewisser Rhythmusstörungen von Wert sind, waren gegenüber dem Strophanthidineffekt nach Aconitin unwirksam. Immerhin war nach Chinin die extrasystolische Frequenzsteigerung nicht ganz so stark ausgeprägt.

SCHERF u. SIEDECK wiesen auf unvorhersehbar unterschiedliche Wirkungen von Chiningaben hin, die unabhängig von der Dosis bei einer Aconitin-Tachykardie zur Nichtbeeinflussung, Regularisierung, aber auch zu Verschlechterungen bis zum Flimmern führten. Diese wechselnden Reaktionen sollen vom jeweiligen Vergiftungszustand der Reizbildungszentren abhängig sein. TRAUTWEIN untersuchte mittels Mikroelektroden die Aktionspotentiale einzelner Muskelfasern des in situ schlagenden Hundeherzens auf die Wirkung des Strophanthins. Durch Chinin erzeugte er eine Insuffizienz und Dilatation. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit, eine Zunahme der Anstiegsdauer und Anstiegslänge der Aktionspotentiale. Unter Strophanthin ($\frac{1}{8}$ mg i.v.) kam es zunächst zu einem weiteren Abfall der Leitungsgeschwindigkeit, die nach Minuten aber wieder anstieg. Es verkürzte sich jedoch sofort die Anstiegslänge und die Anstiegsdauer, was einer Rückkehr zur Norm entspricht. Durch Strophanthin werden damit die Wirkungen des Chinins weitgehend wieder aufgehoben. Erste Anzeichen einer Strophanthinwirkung traten schon nach 2—3 sec auf.

Zwischen dieser elektrophysiologischen Sofortreaktion und der Geschwindigkeit, mit der es bei uns zur extrasystolischen Reaktion kam (15 sec), besteht somit eine zeitliche Übereinstimmung.

Intravenöse Gaben von Acetylcholin bzw. Doryl konnten die durch Strophanthidin nach Aconitin hervorgerufene extrasystolische Reizbildung nicht verhüten und zeigten auch gegenüber der Aconitineigenwirkung ein verschiedenes Verhalten. Im Gegensatz zu den vorher angeführten Untersuchern, die vorwiegend an isolierten Herzen gearbeitet haben, kann möglicherweise hier das wechselnde Verhalten gegenüber dem Acetylcholin am Ganztier durch seine weiteren vielseitigen Angriffsmöglichkeiten erklärt werden (Coronardurchblutung, Blutdruck).

Zusammenfassung.

1. Es wurde die antagonistische Fähigkeit von Stoffen gegenüber einer ventrikulären Extrasystolie durch Aconitin und durch k-Strophanthidin (5% der LD nach HATCHER) nach abgeklungener Aconitineigenwirkung elektrokardiographisch beurteilt.

2. Novocain, Procainamid und Chinin waren nicht imstande, die extrasystolische Strophanthidinwirkung zu verhüten. Unter Chinin war die Frequenz der tertiären Reizbildung nicht so hoch wie ohne Vorbehandlung. Nur mit Novocain war eine Aufhebung der Aconitineigenwirkung möglich.

3. Acetylcholin und Doryl zeigten ebenfalls bei diesen ventrikulären Rhythmusstörungen keine Wirkung im Sinne von Regularisierung.

4. Ganglienblocker (TEA, Pendiomid und C_6) vermochten weder die Aconitineigenwirkung noch die des Strophanthidins nach abgeklungener Aconitinwirkung zu beeinflussen.

5. Calciumchlorid (25 mg/kg) unterbrach die Aconitineigenwirkung und bot außerdem einen Schutz (über etwa 15 min) gegen die verstärkte Wirkung des Strophanthidins auf die tertiäre Reizbildung.

6. Kaliumchlorid (10 mg/kg) rief unter den Bedingungen der Vorbehandlung mit Aconitin dem Strophanthidin gleichartige Wirkungen hervor.

7. Es wird diskutiert, daß die kurzfristige ventrikuläre Extrasystolie durch Strophanthidingaben nach abgeklungener Aconitinwirkung auf einer Kaliumfreisetzung beruhen kann.

Literatur.

- AMANN, A., u. A. JARISCH: Arch. exper. Path. u. Pharmacol **201**, 46 (1943). —
ACHESON, G. H., and G. K. MOE: J. of Pharmacol. **84**, 189 (1945); **87**, 220 (1946).
— BIJLSMA, U. G., u. K. VAN DONGEN: Ergeb. Physiol. **41**, 1 (1939). — O'BRIEN,
G. S., J. ROCKEY, Q. R. MURPHY jr. and W. J. WEEK: Tex. Rep. Biol. a. Med. **2**,
602 (1953). — CATTEL, MC. K.: Fed. Proc. **2**, 76 (1946). — CHARLIER, R., and
A. KLUTZ: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 241 (1951). — DÖRRIE, H., E.
GÖLTNER u. M. SCHWAB: Klin. Wschr. **1954**, 159. — VAN DONGEN, K., and A.
TAAL: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 129 (1950). — ECKEY, P.: Arch.
Kreislafforsch. **5**, 1 (1939). — FISCHER, H.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmacol.
130, 111 (1928); (2) **130**, 194 (1928). — FLECKENSTEIN, A., u. A. HARDT: Klin.
Wschr. **1949**, 360. — FRÖHLICHER, R.: Helvet. physiol. Acta **3**, 231 (1945). —
GINSBURG, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **128**, 126 (1928). — GOFFART,
M., u. Z. M. BACQ: Ergebn. Physiol. **47**, 553 (1952). — GOLDBERG, L., and M. DE
V. COTTEN: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 741 (1951). — GOLDENBERG, M., u.
C. J. ROTHBERGER: Pflügers Arch. **236**, 277 (1935). — GÖING, H., u. W. BUSSE: Arch.
exper. Path. u. Pharmacol. (im Druck). — HOLLAND, W. C., CL. E. DUNN and M. E.
GREIG: Amer. J. Physiol. **170**, 339 (1952). — KISCH, B.: (1) Handb. d. norm. u. path.
Physiol. VII/1, 712 (1926). — (2) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **116**, 189 (1926).
— KÜHNS, K.: Habil.-Schrift, Göttingen 1954. — LAPIQUE, H., u. L. FRÉDÉRIQ:
Arch. internat. Physiol. **21**, 353 (1923). — MARK, L. C., u. Mitarb.: J. of Pharmacol.
102, 5 (1951). — MOE, G. K., and W. A. FREYBURGER: Pharmacol. Rev. **2**, 61 (1950).
— RODECK, H.: Pflügers Arch. **250**, 91 (1948). — ROTHSCHUH, K. E.: Elektrophysiologie
des Herzens. Darmstadt: Steinkopf 1952. — Klin. Wschr. **1954**, 1. — ROTH-
SCHUH, K. E., u. H. BAMMER: Z. exper. Med. **119**, 327 (1952). — SCHERF, D.: Z. exper.
Med. **65**, 255 (1929). — SCHERF, D., u. H. SIEDECK: Z. exper. Med. **96**, 311 (1935).
— STEARNS, N. S., u. Mitarb.: J. Amer. Assoc. **148**, 360 (1952). — STUTZMANN, J. W.,
u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 686 (1948). — TRAUTWEIN, W.:
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 155 (1950). — TRIPOD, J.: Arch. internat.
Pharmacodynamie **85**, 121 (1951). — VANREMORTERE, E., M. GOFFART u. Z. M.
BACQ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 31 (1950). — WEDD, A. M., u. H. A.
BLAIR: Anesthesiology **12**, 261 (1951). — WÉGRIA, R., u. C. J. WIGGERS: Amer. J.
Physiol. **131**, 296 (1940). — WÉGRIA, R., u. N. D. NICKERSON: J. of Pharmacol. **75**,
50 (1952). — WENDHUT, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 386 (1951).
— WENDHUT, G., u. L. LENDLE: Z. exper. Med. **118**, 91 (1951). — V. WERZ, R.: Arch.
exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 70 (1933). — WINKLER, A. W., H. E. HOFF u.
P. K. SMITH: Amer. J. Physiol. **124**, 478 (1938). — WOOLLARD, H. H.: J. of Anat.
60, 345 (1926).

Dr. H. GÖING, Göttingen, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der medizinischen Universität Budapest
(Direktor: Prof. Dr. B. ISSEKUTZ sen.).

Wirkung der Umwelttemperatur auf die Toxizität der Analgetika.

Von

F. HERR, J. BORSI und GY. PATAKY.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. April 1954.)

In unserer früheren Arbeit fanden wir, daß die Toxizität der synthetischen Analgetika in Mäuseversuchen mit der Umwelttemperatur in engem Zusammenhang steht (HERR, BORSI, PATAKY). Polamidon, subcutan verabfolgt, ist 2,88 mal, Hexalgon 2,9 mal, Dolantin 2,75 mal toxischer bei 29° C als bei 18° C. Beim Morphin fanden wir keinen solchen Unterschied, da seine LD₅₀ bei beiden Temperaturen dieselbe ist. Polamidon, intravenös injiziert, ist ebenfalls 2,12 mal toxischer in Wärme als in Kälte. Große Dosen der synthetischen Analgetika verursachen bei 18° C eine starke Senkung der Körpertemperatur, indem sich die Mäuse durchschnittlich auf 22° C abkühlen. Morphin beeinflußt nur unwesentlich die Körpertemperatur der Mäuse. Bei Forschung nach der Ursache dieser Erscheinung konnten wir feststellen, daß in kalter Umgebung die Elimination nicht rascher, sondern eher langsamer erfolgt, als in warmer. Wir nahmen an, daß die bei 18° C gemessene Toxizität deshalb geringer ist, weil die Zellpermeabilität infolge der starken Abkühlung der Mäuse vermindert wird, demzufolge geringere Mengen von Pharmaka ins Zentralnervensystem gelangen, wo sie ihre toxische Wirkung entfalten. Zweck der vorliegenden Arbeit bestand in der Klarlegung der Ursache dieser Differenz zwischen der Toxizität in Wärme und Kälte. Zum Beweis unserer Annahme führten wir Polamidonbestimmungen in den Organen der an verschiedener Temperatur gehaltenen Tiere durch.

Methodik.

Die Versuche wurden mit Morphin, Polamidon (2-dimethylamino-4,4-diphenylheptan-5-on), Hexalgon (1-piperidino-3,3-diphenylhexan-4-on) (HERR, PÓRSZÁSZ) und Dolantin an Albinomäusen (16—24 g) und Ratten (150—220 g) ausgeführt. Aus Gehirn, Blut und Leber der an 18 und 29° C gehaltenen Ratten wurde das Polamidon, aus den Organen der Mäuse das Hexalgon bestimmt. Wir hielten die Versuchstiere 30 min an der gewünschten Temperatur, dann injizierten wir subcutan das zu untersuchende Pharmakon in 0,2—1% iger Konzentration. 30 min nach der Injektion töteten wir die Tiere und bestimmten das Polamidon in ihren Organen mit der colorimetrischen Methode von RICHARD-BOXER-SMITH. Die Eichkurve

nahmen wir in der Weise auf, daß wir den Organen des Normaltieres Polamidon zusetzten, wobei die geringste noch nachweisbare Menge $3 \mu\text{g}$ betrug. Bei Mäusen bestimmten wir das Hexalgon in derselben Weise wie das Polamidon und die geringste nachweisbare Menge des Hexalgons war ebenfalls dieselbe wie bei Polamidon. Hexalgon wurde aus dem Grunde gewählt, weil dessen LD_{50} zweimal größer ist als die des Polamidons, demzufolge war es aus geringeren Organmengen leichter nachzuweisen.

Die Rectaltemperatur der Tiere haben wir mit Quecksilberthermometer bzw. Thermoelement gemessen und bestimmten den O_2 -Verbrauch mit dem von ISSEKUTZ sen. u. ISSEKUTZ jun. angegebenen Verfahren bei 18°C und 29°C . Nach einstündiger Normalperiode nahmen wir die Tiere aus dem Meßgefäß heraus, injizierten das zu untersuchende Analgetikum und setzten dann die Messung nach 20 min während 2 Std fort. Die Messung des O_2 -Verbrauchs der Mäuse führten wir in der Weise aus, daß wir in den etwa 2 Liter fassenden Gefäßen je 3 Mäuse unterbrachten.

Ergebnisse.

Die Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der Polamidonbestimmung bei Ratten, die 30 min nach Verabfolgung von 20 mg/kg getötet wurden. In den Organen der an 29°C gehaltenen Ratten fanden wir stets mehr Polamidon. Diese Differenz war im Gehirn erheblich: 55% . Im Blut war sie noch größer, dagegen konnte in der Leber keine signifikante Differenz nachgewiesen werden.

Tabelle 1. *Analgetikumgehalt der verschiedenen Organe in kalter und warmer Umgebung 30 min nach der Injektion.*

Tier	Injiziertes Analgetikum		Organe	Menge des Analgetikums in den Organen						Diff. %
	Name	mg/kg s.c.		18° C			29° C			
				Zahl der Bestimmungen	µg/g	mittlere Abweichung s	Zahl der Bestimmungen	µg/g	mittlere Abweichung s	
Ratte	Pola- midon	20,0	Gehirn	6	2,0	0,6	6	3,1	0,55	55
			Leber	8	10,2	2,8	6	12,8	4,1	25
			Blut	8	1,2	0,5	8	2,1	0,48	75
Maus	Hexal- gon	33,0	Gehirn	5	4,8	1,2	5	6,7	1,0	40
			Leber	5	19,0	7,7	5	23,0	7,8	21
			Blut	5	2,8	1,2	5	3,8	1,4	36
				96,0	Gehirn	4	30,0	4,0	—	—

Vom Hexalgon injizierten wir sowohl bei 18°C als 29°C in beiden Gruppen die gleiche Menge, die in Wärme gemessene LD_{50} , d. h. 33 mg/kg . Der Organismus der Maus enthielt ebenfalls mehr Analgetikum, wenn wir das Tier in warmer Umgebung hielten als in kalter. Das Gehirn enthielt um 40% mehr bei den an 29°C gehaltenen Mäusen, als bei den an 18°C gehaltenen. In einer Versuchsreihe verabfolgten wir subcutan 9

bei 18° C gehaltenen Mäusen die bei dieser Temperatur gemessene LD_{50} (96 mg/kg). Wie aus der Tabelle ersichtlich, beträgt in diesem Fall der Hexalgongehalt des Gehirns 30 $\mu\text{g/g}$.

Die Bestimmungen zeigen, daß bei Verabfolgung der gleichen Dosis das Gehirn der in Wärme gehaltenen Tiere um 40 bzw. 55% mehr Analgetikum enthält als das der in Kälte gehaltenen Tiere. Dieser Unterschied vermag jedoch die Toxizitätsdifferenzen nicht zu erklären, da 50% der in Kälte gehaltenen Mäuse selbst dann nicht zugrunde geht, wenn die Konzentration des Analgetikums in ihrem Gehirn um 400% höher

ist als in dem der in Wärme gehaltenen Tiere. In Wärme beträgt die LD_{50} 33 mg/kg, wonach 1 g Gehirn 6,7 μg Hexalgon enthält, in Kälte ist die LD_{50} 96 mg/kg, nachher entspricht der Hexalgongehalt des Gehirns 30 $\mu\text{g/g}$. 6,7 $\mu\text{g/g}$ Hexalgon im Gehirn der in Wärme gehaltenen Tiere hat demnach die gleiche Wirkung wie 30 $\mu\text{g/g}$ im Gehirn der in Kälte gehaltenen. Die 40% Differenz bei gleicher Dosis vermag also keine wesentliche

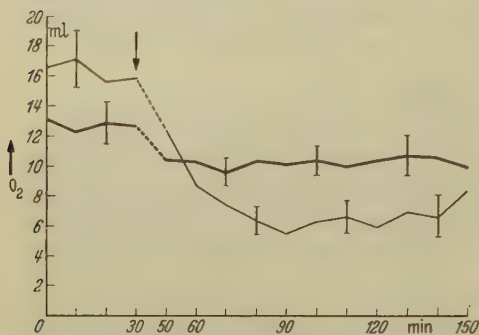


Abb. 1. Wirkung des Polamidons auf den Stoffwechsel der Ratten. 10-minütiger O_2 -Verbrauch auf dm^2 Körperfläche gerechnet. In der 30. min 20 mg/kg Polamidon s.c. Dicke Linie bei 29° C, dünne Linie bei 18° C.

Rolle im Zustandekommen der 3fachen Toxizitätsdifferenz zu spielen. Der Grund dieser Differenz dürfte darin liegen, daß die Resorption des Analgetikums von der Unterhaut in warmer Umgebung rascher erfolgt. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß Polamidon in Wärme, subcutan verabfolgt, 2,88 mal, intravenös verabfolgt, 2,12 mal toxischer wirkt als in Kälte.

In unserer früheren Arbeit fanden wir, daß große Mengen von Polamidon, Dolantin und Hexalgon, Mäusen in kaltem Milieu eingespritzt, eine Temperatursenkung von 12–15° C hervorrufen, in einer Umgebung von 29° C sinkt jedoch ihre Temperatur nicht unter 34° C. Völlig übereinstimmende Ergebnisse zeigten auch unsere an Ratten vorgenommenen Messungen. Weiterhin suchten wir die Frage zu beantworten, wodurch die Abkühlung der Tiere verursacht würde, deshalb führten wir Stoffwechseluntersuchungen an Mäusen und Ratten aus. Die Messungen erbrachten den einstimmigen Beweis dafür, daß die Wirkung der synthetischen Analgetika von der Umwelttemperatur abhängig ist. Polamidon, Hexalgon und Dolantin setzen den O_2 -Verbrauch der bei 29° C gehaltenen Tiere nur wenig, bei 18° C aber beträchtlich herab. In der Abb. 1 ist die Änderung des O_2 -Verbrauches der Ratten nach Verab-

folge von 20 mg/kg Polamidon dargestellt. Die Kurven zeigen den 10minütigen O_2 -Verbrauch in Milliliter auf 1 dm² Körperfläche berechnet und bedeuten den Mittelwert der aus 6 Tieren gewonnenen Ergebnisse. In warmer Umgebung war eine etwa 20%ige Verminderung zu beobachten. Bei 18° C war der O_2 -Grundverbrauch um 20—25% größer als bei 29° C, Polamidon verursachte aber eine Verminderung von 60% und der Stoffwechsel wurde niedriger als bei 29° C. In warmer Umgebung gingen auf die Polamidonwirkung 30% der Ratten während der Stoffwechselmessung zugrunde, dagegen blieben in kalter Umgebung bei derselben Dosis alle Tiere am Leben.

Wie ersichtlich, wurde bei 29° C der Stoffwechsel der Ratten auf die Wirkung der untersuchten synthetischen Analgetika nur unerheblich vermindert und die Körpertemperatur sank auch nicht unter 34° C. Die starke Abnahme des O_2 -Verbrauches bei 18° C findet eine gute Erklärung in dem Umstand, daß unter solchen Verhältnissen die Temperatur der Ratten auf die Wirkung der Pharmaka um 12—15° C sinkt

und nur einige Grad höher ist als die Umwelttemperatur. In kalter Umgebung wird die 36—37° C Körpertemperatur bei den unbehandelten Tieren durch die kompensierende Stoffwechselerhöhung erhalten und die Abkühlung der Tiere auf die Wirkung der untersuchten Analgetika läßt darauf schließen, daß sie in dieser Dosis das Wärmezentrum lähmen. Für diese Annahme spricht auch die von uns gemachte Erfahrung, daß die Temperatur der mit Analgetika behandelten Mäuse schon nach einem kurzen Aufenthalt in einer Umgebung von 36° C, bald auf 40—41° C steigt. In Verbindung mit Prokain haben PULEWKA, BERKAN und KAYMAKTSCHALAN über ähnliche Beobachtungen berichtet. Die Tiere werden nach Verabfolgung großer Mengen von Analgetika gleichsam poikilotherm.

Bezüglich der Stoffwechselwirkung des Morphins fanden wir einen Unterschied zwischen den Ratten und Mäusen. Der O_2 -Verbrauch der Mäuse wird auf die Morphinwirkung bei 29° C und 18° C in gleichem Maße erhöht, was mit der motorischen Erregung und dem Herumlaufen der Tiere erklärt werden dürfte. Der Stoffwechsel der Ratten nimmt bei 29° C um etwa 20% ab, bei 18° C zeigt er aber eine sehr starke Verminderung. Auf die Wirkung von 150 mg/kg Morphin fällt der zehnminütige O_2 -Verbrauch von 16 ml auf 5,5 ml herab (Abb. 2).

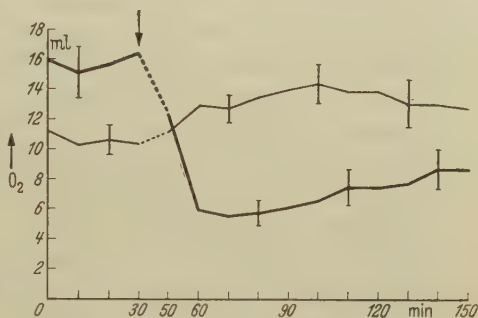


Abb. 2. Wirkung des Morphins auf den Stoffwechsel von Ratten und Mäusen bei 18° C. Dicke Linie: Ratte 150 mg/kg Morphin s.c. (6 Messungen, 6 Ratten). Dünne Linie: Maus 200 mg/kg Morphin s.c. (5 Messungen, 15 Mäuse). Injektion in der 30. min.

Bei Messung der Körpertemperatur fanden wir ebenfalls den beim Stoffwechsel beobachteten Unterschied zwischen Ratte und Maus. Schon in unserer früheren Arbeit hatten wir festgestellt, daß die Abkühlung der Mäuse auf Morphinwirkung in einer Umwelttemperatur von 18° C nicht unter 34° C geht, dagegen sinkt die Temperatur der Ratten schon auf die Wirkung von 100 mg/kg durchschnittlich unter 24° C, ähnlich der Wirkung von Polamidon, Dolantin und Hexalgon auf die Temperatur der Mäuse (HERR, BORSI, PATAKY).

Tabelle 2.

Toxicität des s.c. injizierten Morphins auf Ratten bei verschiedener Temperatur.

Dosis mg/kg	18° C		29° C		34° C	
	Zahl der Ratten					
	benutzt	tot	benutzt	tot	benutzt	tot
50	—	—	4	0	4	3
100	4	0	4	1	4	3
150	4	0	4	3	4	4
200	4	0	4	4	—	—

Nach unseren bisherigen Ergebnissen können wir die in kalter und warmer Umgebung gemessenen Toxizitätsdifferenzen folgendermaßen erklären: Die synthetischen Analgetika lähmen das Wärmesentrum der Tiere, demzufolge kühlen sie sich in kalter Umgebung stark ab. Die Abkühlung erzeugt auch eine starke Verminderung des Stoffwechsels. Die Annahme scheint berechtigt zu sein, daß bei Verminderung des Zellstoffwechsels, die Vergiftung erst durch größere Mengen des Analgetikums erzeugt wird, als bei normalem oder gesteigertem Stoffwechsel. Besteht diese Annahme zu Recht, so läßt dies auch darauf schließen, daß das Morphin für die Ratte in kalter Umgebung weniger toxisch wirkt als in warmer, abweichend von den Mäusen, bei denen das Morphin einen derartigen Unterschied nicht aufweist. Die Ergebnisse unserer hierauf gerichteten Versuche sind in der Tab. 2 zusammengestellt. Obwohl die Zahl der Versuchstiere viel zu klein war, um genaue LD₅₀-Bestimmungen ausführen zu können, zeigen sie jedoch klar den starken Einfluß der Umwelttemperatur auf die Toxizität des Morphins. 200 mg/kg bei 18° C ist noch nicht toxisch, aber bei 34° C vertilgt schon $\frac{1}{4}$ dieser Dosis, 50 mg/kg 3 von 4 Ratten. Demnach bestätigten die Ergebnisse die Richtigkeit unserer Folgerung und die zwischen Mäusen und Ratten in der Morphinwirkung beobachtete Toxizitätsdifferenz geht parallel mit dem verschiedenen Verhalten des Stoffwechsels. Diese Differenz läßt auch darauf schließen, daß die Abhängigkeit der Toxizität von der Umwelt-

temperatur nicht die spezifische Eigenschaft gewisser Verbindungen ist, sondern hauptsächlich damit in Zusammenhang zu stehen scheint, ob der Stoffwechsel in Kälte eine Verminderung erfährt oder nicht.

Besprechung der Ergebnisse.

Die bei der Bestimmung von Polamidon und Hexalgon gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß — gleiche Dosen vorausgesetzt — im Gehirn der an 29° C Umwelttemperatur gehaltenen Ratten, bzw. Mäusen nach 30 min um 55, bzw. 40% mehr Analgetikum nachweisbar ist, als im Gehirn der an 18° C gehaltenen Tiere. Wenn wir aber nicht gleichgroße, aber ähnlich wirkende Dosen (LD_{50}) verabfolgen, so enthält das Gehirn der in Kälte gehaltenen Mäuse 4mal mehr Analgetikum als das Gehirn der in Wärme gehaltenen Tiere. Diese Beobachtung zeigt, daß höhere Konzentration am Angriffspunkt des Pharmakons nicht unbedingt stärkere Wirkung bedeutet, andererseits ist stärkere Wirkung keine gesetzmäßige Folge der höheren Konzentration. Außer der Menge des Pharmakons scheint in der Entwicklung der Wirkungsstärke der Zustand der Zellen eine wesentliche Rolle zu spielen. Nach unseren Erfahrungen ist zur Erreichung derselben Wirkung (LD_{50}) bei 18° C Umwelttemperatur eine nahezu dreifache Dosis zu verabfolgen, wie bei 29° C, in dem Fall, wenn sich die Versuchstiere abkühlen. Abkühlung bei Lähmung der Wärmeregulation hat auch die Verminderung des Stoffwechsels zur Folge. Tritt die letztere nicht ein, so entsteht auch keine Differenz zwischen der in kalter und warmer Umgebung gemessenen Toxicität. Bei niedrigem Zellstoffwechsel werden die Zellen durch größere Dosen von Analgetika vergiftet als bei normalem Stoffwechsel.

Während unserer Arbeit erschien die Mitteilung von SUNG u. WAY, in der die Autoren feststellen, daß die Toxicität vom Polamidon durch Thyroxin gesteigert, durch Schilddrüsenexstirpation vermindert wird. Ihre Ergebnisse sprechen ebenfalls dafür, daß zwischen der Toxicität und dem Polamidongehalt des Gehirns und anderer Organe kein enger Zusammenhang besteht.

Nach den Mitteilungen von SIEVERS u. McINTYRE hängt die Toxicität des Prokains ebenfalls von der Umwelttemperatur ab. Die temperatursenkende Wirkung des Prokains ist bekannt (GLAUBACH u. PICK), andererseits haben ISSEKUTZ u. KÖVÁRY nachgewiesen, daß Prokain in kalter Umgebung (20° C) den Stoffwechsel vermindert, in warmer (28° C) aber nicht beeinflußt. Diese Wirkungen des Prokains sind also identisch mit denen der synthetischen Analgetika. Vorbehandlung mit Thyroxin, wie es ISSEKUTZ u. KÖVÁRY festgestellt hatten, verhindert die temperatursenkende Wirkung des Prokains. Diese Daten lassen die Annahme zu, daß Zunahme der Toxicität des Polamidons nach Thyroxinvorbehandlung (SUNG-WAY) ebenfalls dadurch bedingt sei, daß in diesem Fall die Körpertemperatur der Tiere auf Polamidonwirkung nicht erniedrigt wird. Andererseits dürfte die Schilddrüsenexstirpation nach Verabfolgung von Polamidon die Körpertemperatur stark herabsetzen, wodurch das letztere für die Tiere weniger toxisch wird. Leider geben die genannten Autoren nicht an, bei welcher Temperatur sie ihre Versuche ausgeführt hatten.

Mehrere Pharmaka sind uns bekannt, die bei kalter Umwelttemperatur weniger toxisch sind als bei warmer, aber auch solche, deren Toxizität in Kälte zunimmt (zusammenfassende Literatur siehe bei FUHRMANN). Nach FUHRMANN ist die Wirkungsstärke das Ergebnis von zwei chemischen Reaktionen, die eine besteht in der Verbindung zwischen Arzneimittel und Angriffspunkt, die andere in der Elimination des Pharmakons. In welcher Weise die Wirkungsstärke des Arzneimittels von der Temperatur abhängt, ist dadurch bestimmt, welche chemische Reaktion von der Temperaturveränderung stärker beeinflußt wird. Wir sind jedoch — wie schon oben erwähnt — der Ansicht, daß bei den Analgetika nicht die Elimination des Pharmakons, sondern der Stoffwechsel die entscheidende Rolle spielt. Beim Morphin z. B. besteht in bezug auf die in Kälte und Wärme gemessene Toxizität ein Unterschied zwischen Maus und Ratte, die am besten damit zu erklären ist, daß Morphin den Stoffwechsel der Mäuse nicht, den der Ratte aber stark vermindert.

Bezüglich des BAL hatte McDONALD festgestellt, daß seine Toxizität von der Umwelttemperatur abhängig ist. Nach seinen Untersuchungen ist die Toxizität bei 17,2° C am geringsten; sowohl Erniedrigung als Erhöhung der Temperatur haben Steigerung der Toxizität zur Folge. Unserer Meinung nach sind alle das Wärmezentrum lähmenden Pharmaka bei tiefer Temperatur toxischer, da unter 17° C die übermäßige Abkühlung schon den Tod verursacht. Dieser Umstand erklärt die Beobachtung von HERRMANN, daß Morphin für Ratten bei 3° C toxischer ist als bei Zimmertemperatur.

Die in der Therapie übliche künstliche Abkühlung ermöglicht in vielen Fällen auch die Ausführung solcher Operationen, die bei normaler Körpertemperatur mit hoher Mortalität einhergehen (HUGUENARD). Zu den Bestandteilen des zur künstlichen Abkühlung verwandten „coctail lytique“ gehören auch das Dolantin und Prokain. Diese zwei Mittel beseitigen durch Ausschaltung des Wärmezentrums die unter normalen Verhältnissen funktionierende Gegenregulation, so vermag sich auch der Organismus abzukühlen und der Stoffwechsel wird vermindert. Unseres Erachtens bedeutet gerade die Stoffwechselverminderung den wichtigsten Faktor bei den in künstlicher Abkühlung durchgeführten chirurgischen Eingriffen. Der herabgesetzte O₂-Bedarf der Zellen ermöglicht es, daß bei 26° C Körpertemperatur das Herz für einige Minuten von der Zirkulation ausgeschaltet werden kann (LEWIS und TAUFIC).

Während dem Winterschlaf ist die Körpertemperatur der Tiere außerordentlich tief und ihr Grundumsatz ist ebenfalls vermindert. Diese Tatsache macht es erklärlich, daß eine große Anzahl von Arzneimitteln im Winterschlaf viel weniger toxisch wirkt, als im Wachzustand (ARBUZOV).

Zusammenfassung.

1. Wir führten Bestimmungen von Polamidon und Hexalgon in Gehirn, Blut und Leber der bei 18° C und 29° C gehaltenen Mäuse und Ratten aus.

2. 30 min nach der subcutanen Verabfolgung gleicher Dosen ist im Gehirn der in warmer Umgebung gehaltenen Tiere um 40 bzw. 55% mehr Hexalgon, bzw. Polamidon, zu finden als bei 18° C.

3. Nach gleich wirkenden Dosen (LD₅₀) ist im Gehirn der kühl gehaltenen Mäuse viermal so viel Hexalgon nachzuweisen als im Gehirn der in der Wärme gehaltenen Tiere. Unsere Beobachtung weist darauf hin, daß die am Angriffspunkt vorhandene größere Pharmakonmenge nicht notgedrungen auch eine stärkere Wirkung bedeutet.

4. Wir führten Stoffwechselbestimmungen aus und fanden, daß große Dosen von Polamidon, Hexalgon und Dolantin den Stoffwechsel von Ratten und Mäusen in einer Umgebung von 29° C nur wenig vermindern, dagegen erfährt bei 18° C der Stoffwechsel dadurch eine erhebliche Verminderung.

5. Bezüglich der Wirkung des Morphins auf den Stoffwechsel herrscht eine Differenz zwischen Ratte und Maus. In einer Umgebung von 18° C wird der Stoffwechsel der Mäuse erhöht, der der Ratten dagegen hochgradig vermindert.

6. Die Toxicität des Morphins für Ratten ist größer bei 29° C als bei 18° C.

7. Die Erklärung der bei 18 und 29° C Umwelttemperatur gemessenen verschiedenen Toxicität liegt unseres Erachtens darin, daß der Stoffwechsel bei 18° C eine Abnahme erleidet und bei niedrigem Zellstoffwechsel der Organismus erst durch größere Mengen von Analgetika vergiftet wird.

Literatur.

ARBUZOV, SZ. JA.: *Uszpehi szovremennoj biologii* **33**, 117 (1952). — FUHRMAN, F. A.: *Physiol. Rew.* **26**, 247 (1946). — GLAUBACH, S., u. E. P. PICK: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **162**, 537 (1931). — HERR, F., J. BORSI u. GY. PATAKY: *Acta physiol. (Budapest)* **4**, 363 (1953). — HERR, F., u. J. PÓRSZÁSZ: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **210**, 294 (1950). — HERRMANN, J. B.: *J. of Pharmacol.* **72**, 130 (1941). — HUGENARD, P.: *Der Anaesthetist* **2**, 33 (1953). — ISSEKUTZ, B. u. B. ISSEKUTZ jr.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **199**, 306 (1942). — ISSEKUTZ, B., u. F. KÖVÁRY: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **200**, 156 (1942). — LEWIS, F. J., u. M. TAUFIC: *Surgery (St. Louis)* **33**, 52 (1953). — McDONALD, F. F.: *Brit. J. Pharmacol.* **3**, 116 (1948). — PULEWKA, P., D. BERKAN u. S. KAYMAKTSCHALAN: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **216**, 169 (1952). — RICKARDS, J. C., G. E. BOXER and C. C. SMITH: *J. of Pharmacol.* **98**, 380 (1950). — SIEVERS, R. F., u. A. R. McINTYRE: *J. of Pharmacol.* **59**, 90 (1937). — SUNG, C. Y., u. E. L. WAY: *J. of Pharmacol.* **108**, 1 (1953).

Dr. F. HERR, Budapest VIII/Ungarn, Üllői u 26. Pharmacol. Inst. d. med. Univ.

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. FRIEDRICH), Abt. Pharmakologie, und dem Pharmakolog. Institut der Humboldt-Universität (Direktor: Prof. Dr. F. JUNG).

Die Beeinflussung des Membranpotentials der Gelatinemembran durch Formaldehyd.

Von

LOTHAR WALLIS.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1954.)

Über den Wirkungsmechanismus gerbender Stoffe kann man sich verschiedenartige Vorstellungen machen. Besonders einleuchtend erscheint der Gedanke, daß durch das Agens innerhalb oder zwischen Proteinmolekülen Brückenbindungen hergestellt werden. Dadurch erhalte das Protein eine größere chemische und thermische Stabilität (Vernetzungstheorie: WILBRANDT, RYSER, WITT). Diese Hypothese erhält durch Versuche von SCHELER und JUNG über den Einfluß des Formalins auf Hämoglobin bzw. dessen Thermodynamik eine Stütze. Im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen aus unserem Institut über den Einfluß des Formalins auf die Stabilität einer Membrankomponente des roten Blutkörperchens (JUNG unveröffentlicht) sollte nun der Einfluß des Formalins wie anderer gerbender Stoffe auf die Membranpotentiale einfachster Proteinmembranen untersucht werden. Die theoretische Grundlage hierzu liefert die Theorie von K. H. MEYER und T. TEORELL über das Zustandekommen und die Berechnung von Membranpotentialen. Sie gibt die Möglichkeit, auf Grund einiger leicht meßbarer Parameter Aussagen über das Verhältnis von Kationen- und Anionenbeweglichkeit und über die Festionenkonzentration in der Membran zu machen. Erfolgt die Vernetzung durch Formalin infolge einer Blockierung polarer Gruppen in der Membran, so muß sich das an den entsprechenden Meßdaten feststellen lassen.

Untersucht wurde der Gerbeffekt von Formalin auf die Gelatinemembran und das Perikard des Frosches.

Eine eingehende Diskussion unserer Versuchsergebnisse, namentlich in bezug auf den an Zellen feststellbaren Adstriktionseffekt ist noch nicht möglich. Die außerordentliche Divergenz der physikochemischen Wirkungen gerbender Stoffe spiegelt sich in einer ebenso großen Divergenz der Effekte selbst an einfachsten Zellen wieder. Dies belegen etwa die elektronenoptischen Untersuchungen von JUNG an Formalin-, Zinksalz- und Bleisalz-behandelten Blutzellen, die Untersuchungen

von BOHLMANN an Tannin-behandelten Blutzellen und vor allem die WILBRANDT-schen Studien über die Permeabilitätseffekte der verschiedenartigsten Substanzen. Deshalb kann es nicht gestattet sein, auf Grund von Versuchen mit *einem* gerbenden Agens an einigen Objekten allgemeine Hypothesen aufzustellen.

Theorie und Meßmethodik.

a) Die theoretische Grundlage für die folgenden Messungen lieferte die durch K. H. MEYER und SIEVERS wie T. TEORELL gegebene Erweiterung der DONNANSchen Theorie auf reale Membranen. Sowohl ihre Ableitung wie Auswertung ist bei K. H. MEYER und H. MARK, S. 891 ff., eingehend dargestellt; im Hinblick auf die leichte Zugänglichkeit sowie die heute voraussetzbare Kenntnis dieser wichtigen Theorie wird auf eine Wiedergabe verzichtet. Zur Ermittlung der Selektivitätskonstanten A (einer Maßzahl der ortsfesten Ionenkonzentration in der die Membran imbibierenden Flüssigkeit), wie des Sieb-effektes U_k/U_a (also des Verhältnisses der Wanderungsgeschwindigkeiten von Kat- und Anionen innerhalb der Membran), wird die Membran zwischen 2 Lösungen gebracht, deren eine die Konzentration c_1 , deren andere die Konzentration $c_2 = 2 \cdot c_1$ des zu untersuchenden binären Elektrolyten besitzt. c_1 wird dann in einem möglichst weiten Bereich variiert. Mit zunehmender Konzentration nähert sich dabei das Membranpotential einem charakteristischen Grenzwert, dem freien Diffusionspotential $E_{Diff.}$, bei welchem der Einfluß der Selektivität verschwindet. Mit abnehmender Konzentration bewegt sich das Potential gegen das Dialysepotential für das Kation (bei Kationenpermeabilität) bzw. das Anion (bei Anionenpermeabilität). Die einzelnen Meßwerte für die Membranpotentiale werden dann gegen $\log 1/c_1$ aufgetragen und mittels der von K. H. MEYER angegebenen Kurventafel A , sowie U_k/U_a ermittelt. Anionenpermeable Membranen sind durch steigende, kationenpermeable durch fallende Potentiale bei zunehmender Konzentration gekennzeichnet.

Bei der Angabe der Potentiale bezieht sich das Vorzeichen immer auf die verdünntere Lösung. Die Endpunkte jeder Meßreihe sind als $E_{Diff.}$ neben dem Werte für A und U_k/U_a angegeben.

b) Die Membran wurde zwischen zwei plangeschliffenen, mit Gummiringen abgedichteten Meßzellen eingespannt; sie konnte durch einen geeigneten Mechanismus schnell ausgewechselt werden (Abb. 1). Für Versuche an physiologischen Membranen waren Vorrichtungen zum Durchleiten von Sauerstoff vorgesehen. Zur Potentialmessung diente ein FEUSSNER-Kompensator (R. F. T.) mit einem Spiegelgalvanometer (R. F. T.) von einer Empfindlichkeit von $2,2 \times 10^{-8}$ A/sec als Nullinstrument. Als Meßelektroden dienten zwei Kalomelektroden, die über Kaliumchlorid-Brücken in die Meßzellen eintauchten und deren Potential bis auf 0,3–0,6 mV übereinstimmte. Die Differenz wurde jedesmal gemessen und in Abzug gebracht. Die Ablesegenauigkeit betrug $\pm 0,001$ mV, die Meßgenauigkeit $\pm 0,2$ mV. Die Potentialeinstellung wurde 20–40 min verfolgt, da sich in dieser Zeit meist ein konstantes Potential einstellte. Zweckmäßig war es, die Meßreihen mit den

verdünnten Lösungen zu beginnen, da hierdurch eine schnellere Potential-einstellung erzielt werden konnte.

Als Träger der Gelatinemembran benutzte ich eine von LANDSBERG beschriebene Vinidurscheibe mit einer Bohrung von 4 mm Durchmesser, in die die Gelatine in zähflüssigem Zustand eingetropfte wurde. Zur Halterung des Froschperikards dienten zwei ähnliche Scheiben, zwischen die die Membran eingespannt wurde. Hierzu war die Bohrung mit einem kleinen Wulst umgeben. Sämtliche Messungen wurden mit NaCl-Lösungen durchgeführt.

Für die Versuche an der isoelektrischen Gelatine benutzte ich ein 10%iges, dialysiertes Gel (Nährbodengelatine), im folgenden als is. Gel. bezeichnet, sowie

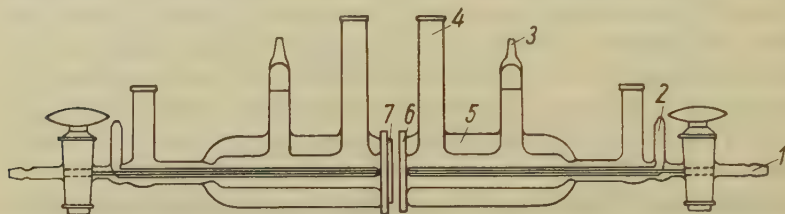


Abb. 1. Meßzelle. 1 Zuführung der Meßlösung. 2 Sauerstoffzufuhr. 3 Ableitung der Meßlösung. 4 Einführung der Kalomelektroden. 5 Temperiermantel. 6 Dichtungsscheiben. 7 Membran. — Die Meßlösung wird durch das Zuführungsrohr bis dicht an die Membran herangeführt und fließt durch den Überlauf wieder ab. Auf diese Weise wird eine gleichmäßige Zirkulation der Lösung erzielt. Der Sauerstoff perlt in möglichst kleinen Bläschen durch die Capillare.

ein 15%iges, undialysiertes Gel (H_2O -Gel.). Ich variierte ferner den p_H der Gelatine, indem ich ein 25%iges Gel mit 0,1 n HCl (HCl-Gel.) und mit 0,1 n NaOH (NaOH-Gel.) ansetzte, sowie den p_H der Meßlösungen durch Zusatz von 0,1 n HCl und 0,1 n NaOH. Die Anwendung von Puffern schien ungeeignet, da hierdurch die Auswertung der Kurven nach der MEYER-TEORELLSchen Theorie zu sehr erschwert werden würde. Die störenden Einflüsse der Quellungsvorgänge auf die Potentialeinstellung konnten durch 2stündiges Einlegen der Gelatinemembran in 0,1 n NaCl ausgeschaltet werden, wobei sich in allen Fällen ein definierter Quellungszustand einstellte. Zur Einwirkung von Formaldehyd wurde die Membran für die angegebene Zeit in Formaldehydlösung gelegt und danach das anhaftende bzw. lose gebundene Formaldehyd mit 0,1 n NaCl-Lösung ausgewaschen. Das Perikard wurde von Fröschen (*Rana esculenta* und *R. temporaria*) gewonnen, die in der Gefangenschaft überwintert hatten. Die Tiere wurden dekapitiert, das Perikard herauspräpariert, kurz in Tyrode gespült und sofort in die Apparatur gebracht.

Ergebnisse.

a) Unbehandelte Gelatine. Die Versuchsergebnisse an unbehandelten Gelatinemembranen sind in Abb. 2 und in der Tab. 1 wiedergegeben. Der isoelektrische Punkt der verwandten Gelatine war zuvor nach dem von MICHAELIS angegebenen Verfahren mittels Alkohol zu p_H 5,0 bestimmt worden. Bei Messungen an Gelatinezubereitungen, welche durch Dialyse isoelektrisch gemacht worden waren, zeigten sich die Membranpotentiale von $\log \frac{1}{c_1}$ praktisch unabhängig. Bei der HCl-Gelatine wie der NaOH-Gelatine ergaben sich starke Abhängigkeiten, welche im Detail aus den in Abb. 2 wiedergegebenen Versuchsbeispielen entnommen werden können.

Aus den in Abb. 2 wiedergegebenen Abhängigkeiten wurde nunmehr nach dem MEYERschen Verfahren A und U_k/U_a ermittelt. In der Tabelle sind 2 Versuche an isoelektrischer Gelatine wie die Mittelwerte von je 5 Versuchen an HCl- und NaOH-Gelatine wiedergegeben. Der in der Tabelle mitgeteilte pH-Wert der Gelatine war colorimetrisch mit Farb-indicatoren ermittelt worden, da in der Gelatine keine Messung mit Glaselektroden möglich war.

Sowohl aus den Kurven wie den Tabellen läßt sich ablesen, daß die isoelektrische Gelatine keine selektive Permeabilität zeigt, während die HCl-Gelatine anionen-, die NaOH-Gelatine kationenpermeabel ist. Dieses Ergebnis entspricht den üblichen theoretischen Vorstellungen und bedarf keiner weiteren Besprechung. Der Beweglichkeitsquotient innerhalb der Membran entspricht innerhalb der Fehlergrenzen den für wäßrige Natriumchloridlösung bekannten Werten.

b) Formalin-gegerbte Gelatine. Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 3 a—d und Tab. 2 zusammengestellt. Die in diesen Versuchen verwandte Gelatine zeigte am „isoelektrischen Punkt“ noch eine eindeutige Anionenpermeabilität ($A = 0,02$ Mol/l). Abb. 3a zeigt in ihrem ersten Teil die Meßergebnisse an der isoelektrischen Membran (Kurve 1), nach etwa 28stündiger Einwirkung von 20% igem Formalin (Kurve 2) und nach

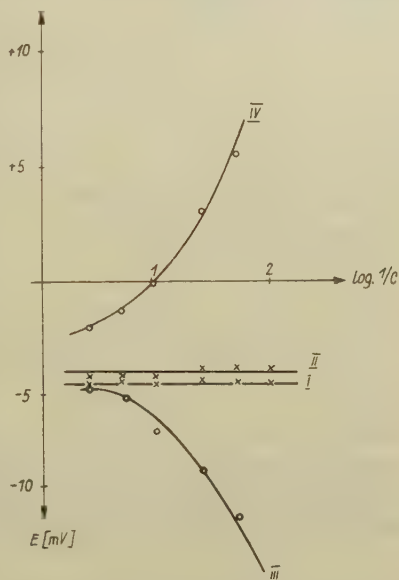


Abb. 2. Selektivitätskurven der unbehandelten Gelatinemembran zur Ermittlung von A und U_k/U_a nach K. H. MEYER. Ordinate E (mV), Abszisse $\log 1/c$ (siehe Tab. 1). I und II is.-Gel.: keine Selektivität, III HCl-Gel.: Anionen-selektivität, IV NaOH-Gel.: Kationen-selektivität.

Tabelle 1.

Membran	pH der Gelatine	pH der Lösung	A Mol/l	$E_{Diff.}$ mV	U_k/U_a	Selektivität	Abb. 2
is.-Gel.	5,0	6,8		-4,49	0,60	nicht selektiv	I
is.-Gel.	5,0	4,7		-4,01	0,63	permeabel	II
HCl-Gel.	4,1	6,8	0,032 $\pm 0,004$	-4,4	0,60 $\pm 0,03$	anionenpermeabel	III
NaOH-Gel.	8,7	6,8	0,034 $\pm 0,006$	-2,1	0,71 $\pm 0,12$	kationenpermeabel	IV

48stündigem Einwirken von 20% igem Formalin (Kurve 3). Der zweite Teil soll einen Eindruck von der zeitlichen Veränderung der Größen A

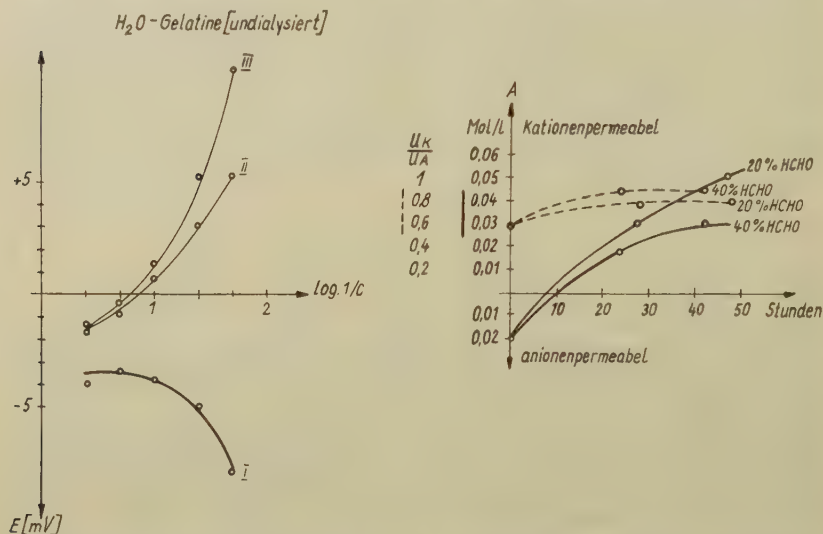


Abb. 3a. Einwirkung von Formaldehyd auf H_2O -Gel. A Selektivitätskurven (Werte für A und U_k/U_a siehe Tab. 2: Ordinate E (mV), Abszisse $\log 1/c$. I unbehandelt, II nach 28stündiger Einwirkung von 20% HCHO, III nach 48stündiger Einwirkung von 20% HCHO. B Veränderung der Selektivitätskonst. A (ausgezogene Linie) und des Beweglichkeitsquotienten U_k/U_a (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der Dauer der Formaldehydeinwirkung.

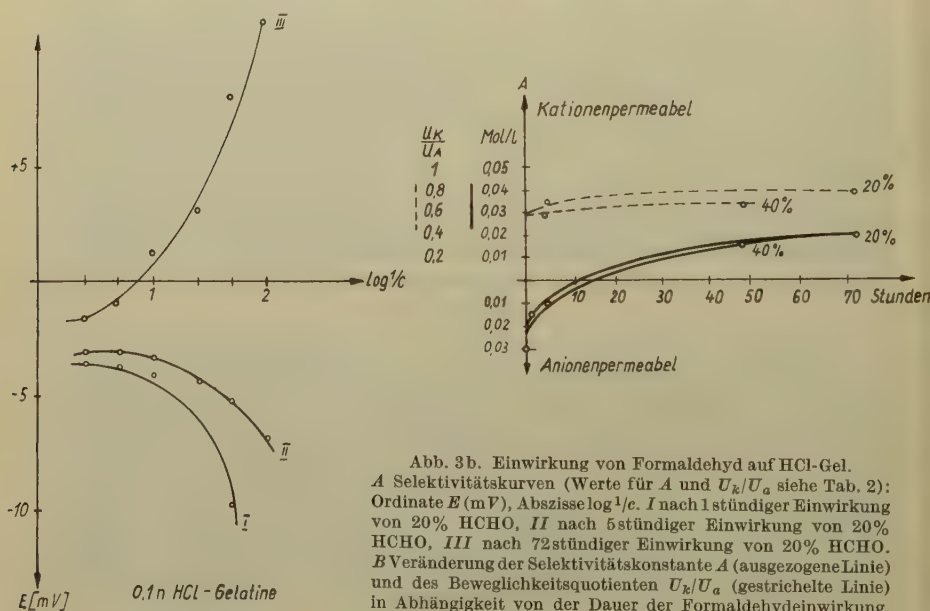


Abb. 3b. Einwirkung von Formaldehyd auf HCl-Gel. A Selektivitätskurven (Werte für A und U_k/U_a siehe Tab. 2: Ordinate E (mV), Abszisse $\log 1/c$. I nach 1stündiger Einwirkung von 20% HCHO, II nach 5stündiger Einwirkung von 20% HCHO, III nach 72stündiger Einwirkung von 20% HCHO. B Veränderung der Selektivitätskonstante A (ausgezogene Linie) und des Beweglichkeitsquotienten U_k/U_a (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der Dauer der Formaldehydeinwirkung.

und U_k/U_a unter der Formalineinwirkung wiedergeben. Praktisch ebenso wirkte eine 40%ige Formalinlösung, doch war bei dieser der Effekt insgesamt etwas geringer als bei der 20%igen Lösung.

Ganz entsprechend war das Versuchsergebnis an der HCl-Gelatine; der Effekt der Formalinwirkung trat hier etwas schneller ein und erreichte nicht so hohe Werte wie bei der isoelektrischen Membran. Abb. 3b gibt die Ergebnisse eines Versuches wieder.

Wird die durch Formalin-einwirkung kationenpermeabel gewordene Membran in stärker saure Lösungen gebracht, so tritt wieder Anionenpermeabilität ein. Einen entsprechenden Versuch gibt Abb. 4c wieder: Hier wurde eine bei p_H 6,8 anionenpermeable Membran (Kurve 1) durch Formalinbehandlung kationenpermeabel (Kurve 2); diese Kationenpermeabilität blieb noch bei p_H 4,7 bestehen (Kurve 3), um sich bei p_H 3,2 wieder in Anionenpermeabilität umzukehren.

Abb. 3d zeigt schließlich die Wirkungen des Formalins an der NaOH-Gelatine. Sie scheinen zunächst nur ganz unwesentlich, indem die Membran kationenpermeabel bleibt und zudem auch der Beweglichkeitsquotient sich nicht erheblich verändert. Dies ist auf Grund der theoretischen

Vorstellungen überraschend und dürfte mit einem Versagen der Meßmethodik in diesem Bereich zusammenhängen.

In den gesamten Versuchen mit Formalin veränderten sich die Werte für U_k/U_a gegen 1. Zudem war nicht nur in den Versuchen mit der H_2O -Gel., sondern insgesamt deutlich, daß die 40%ige Formalinlösung gegenüber der 20%igen Lösung keine ihrer hohen Konzentration entsprechende Wirkung besaß.

c) Versuche am Froschperikard. Diese Versuche wurden den Gelatineversuchen gegenübergestellt, weil auf Grund von histologischen Untersuchungen das Froschperikard eine reine Bindegewebsmembran darstellen dürfte. Trotzdem möchten wir den an diesen Membranen für die

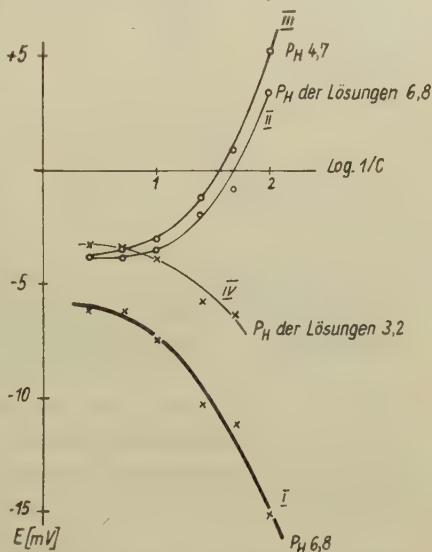


Abb. 3c. Der Einfluß des p_H auf die Selektivität einer formalinbehandelten Membran. Selektivitätskurven einer H_2O -Gelatine bei Varilierung des p_H der Lösungen. Ordinate E (mV), Abszisse $\log 1/c$. I unbehandelt (p_H der Lösungen 6,8), II nach Formaldehydeinwirkung (p_H 6,8), III nach Formaldehydeinwirkung (p_H 4,7), IV nach Formaldehydeinwirkung (p_H 3,2).

Größen A und U_k/U_a erhaltenen Werte nicht die konkrete physikalische Bedeutung unterstellen, welche sie am Modell besitzen. Sie werden daher hier als A und U bezeichnet.

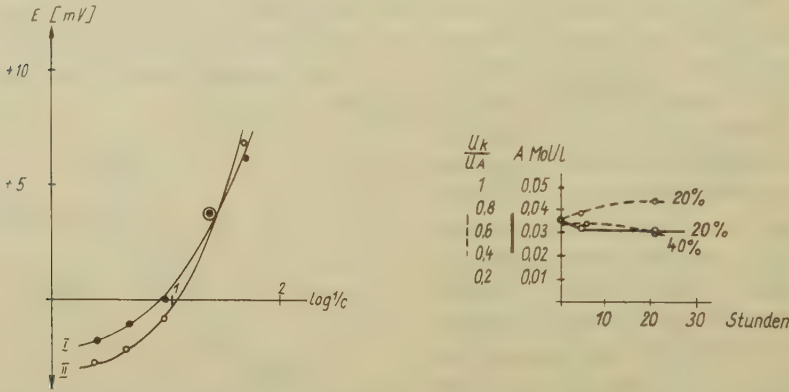


Abb. 3d. Einwirkung von Formaldehyd auf NaOH-Gel. Ordinate E (mV), Abszisse $\log c$. A Selektivitätskurven (Werte für A und U_k/U_a siehe Tab. 2): I nach 4 stündiger Einwirkung von 20% HCHO, II nach 20 stündiger Einwirkung von 20% HCHO. B Veränderung der Selektivitätskonstante A (ausgezogene Linie) und des Beweglichkeitsquotienten U_k/U_a (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit von der Dauer der Formaldehydeinwirkung.

Tab. 3 enthält Meßergebnisse an unbehandelten und formalin-behandelten Membranen. Abb. 4 zeigt hierzu einen Originalversuch. Die unbehandelte Membran zeigt eine schwache Kationenselektivität, welche durch die Formalinbehandlung nicht modifiziert wird.

Tabelle 2.

	Konz. HCHO %	Dauer Std	pH Gelatine	pH Lösung	A Mol/l	E_{Diff}	U_k/U_a		Abb. 3
H ₂ O-Gel.			5	6,8	0,02	—3,6	0,60	anionenpermeabel	Abb. 3a
	20	28			0,03	—1,5	0,80	kationenpermeabel	I
	20	48			0,05	—1,4	0,80	"	II
	40	24			0,02	—1,0	0,9	"	III
	40	48			0,03	—1,0	0,9	"	
HCl-Gel.			4,1	6,8					Abb. 3b
	20	1			0,016	—3,8	0,60	anionenpermeabel	I
		5			0,01	—3,2	0,71	"	II
		72			0,02	—2,0	0,80	kationenpermeabel	III
	40	1			0,016		0,60	anionenpermeabel	
NaOH-Gel.			8,7	6,8					Abb. 3d
		5			0,01	—3,5	0,60	"	
		48			0,016		0,70	kationenpermeabel	
	20	4			0,05	—2,2	0,8		I
		20			0,03	—1,0	0,9		II
	40	5			0,02	—3,0	0,7	kationenpermeabel	
		20			0,03	—3,0	0,6		

Tabelle 3.

Versuch	Konz. HCHO %	Dauer Std	Lösung pH	A Mol/l	U		Abb. 4
1.		0	6,8	0,005	0,57	kationenpermeabel	1
	3,5	12	6,8	0,003	0,60	"	2
	20	48	6,8	0,004	0,60	"	3
2.		0	6,8	0,001	0,85	kationenpermeabel	4
	20	48	6,8	0,001	0,61	"	5

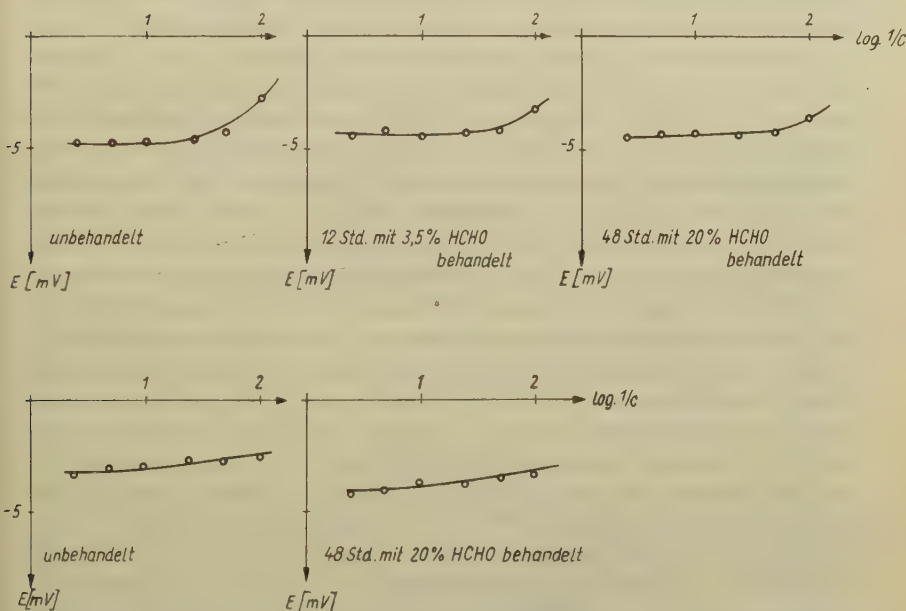


Abb. 4. Einwirkung von Formaldehyd auf das Froschperikard (Kurve 1—5). Versuchsergebnisse an zwei verschiedenen Perikardmembranen. Selektivitätskurven zur Ermittlung von A und U . (Siehe Tab. 3.) Ordinate E (mV), Abszisse $\log 1/c$.

Diskussion.

Versuche an der Gelatinemembran wurden bereits von MICHAELIS und FUJITA beschrieben. Sie führten zu demselben Ergebnis wie die meinen: Es besteht keine Selektivität am I.P., Anionenpermeabilität im sauren, Kationenpermeabilität im alkalischen Bereich. Zu bedenken ist nur, daß FUJITA zur Verhinderung der Quellung unter anderem auch eine mit 3,5% iger Formalinlösung gegerbte Gelatine benutzte. Wenn eine so schwach konzentrierte Lösung auch noch keinen starken Gerbeffekt ausübt, so ist doch eine geringe Veränderung der Selektivität nicht ganz ausgeschlossen. Dies könnte in dem Falle zutreffen, in dem eine formalin-

gegerbte is. Gel. positive Potentialwerte zeigte. Da in dem von mir beschriebenen Versuch die is. Gel. auch bei Benutzung neutraler Meßlösungen (pH 6,8) noch nicht kationenpermeabel war, möchte ich die positiven Potentialwerte FUJITAS auf einen Gerbeffekt zurückführen, wie er in meinen Versuchen beobachtet wurde. Im Gegensatz hierzu fand ich an einem undialysierten Präparat bei einem pH von 6,8 deutliche Anionenselektivität. Diese führe ich auf das Vorhandensein positiver Ladungen im Eiweiß zurück. Siebeffekte fand ich bei keiner der untersuchten Gelatinemembranen, wie aus den U_k/U_a -Werten zu erkennen ist. Dies ist auch bei der im Verhältnis zum Durchmesser der diffundierenden Ionen weitmaschigen Struktur des Gelatinegels nicht zu erwarten.

Die Gerbreaktion des Formaldehyds wurde bisher nur am Kollagen untersucht. Hier wird die NH_2 -Gruppe des Lysins jeweils mit einer anderen funktionellen Gruppe unter Einfügung einer Methingruppe verknüpft. Die Reaktion verläuft am schnellsten bei einem pH von 6—8, was darauf schließen läßt, daß die ungeladene NH_2 -Gruppe Angriffspunkt des Formaldehyds ist. Da die Verhältnisse bei der Gelatine ganz ähnlich liegen — wir haben es nur mit niedriger molekularen Peptidketten zu tun — dürfte es erlaubt sein, diese Erkenntnisse auch hierauf zu übertragen.

Der Umschlag der Anionenselektivität in die Kationenselektivität läßt sich durch die Annahme erklären, daß durch Bindung einer NH_2 -Gruppe eine negativ geladene Gruppe frei wird, wie es ähnlich bei der SCHIFFSchen Base der Fall ist. Die Reaktion geht bei laufender Formaldehydbindung einem Grenzwert entgegen, der dann erreicht ist, wenn alle NH_2 -Gruppen besetzt sind. Dieser Grenzwert spiegelt sich auch in meinen Versuchen wieder. Er wird bei der HCl-Gel. früher erreicht als bei der H_2O -Gel., da im ersteren Falle mehr ungeladene NH_2 -Gruppen vorliegen. Eine Proportionalität zwischen dem Formaldehydgehalt und Gerbwirkung konnte ich nicht feststellen. Es hatte den Anschein, als wäre die 40%ige Formaldehydlösung infolge Polymerisation zu einer unwirksameren Verbindung etwas unwirksamer als die 20%ige Lösung. Bei der HCl-Gelatine hatten beide Lösungen annähernd gleiche Wirksamkeit.

Die Bindung des Formaldehyds an die NH_2 -Gruppe wird durch ansteigende H^+ -Konzentration gespalten. Dies zeigt der Versuch, in dem ich die durch Gerbung kationenpermeabel gewordene Membran in eine Meßlösung vom pH 3,2 brachte und wieder Anionenselektivität feststellen konnte.

Wenn an der NaOH-Gel. der zu erwartende Effekt ausblieb, so kann dies nur mit einem Versagen der Meßmethodik erklärt werden. Außer der Veränderung der Selektivitätskonstanten A kann sowohl bei der H_2O -Gel. wie bei der HCl- und NaOH-Gel. mit der Dauer der Einwirkung ein Konvergieren des U_k/U_a -Wertes gegen 1 festgestellt werden, das heißt:

Durch einen allmählich stärker werdenden Siebeffekt (Verengung des Maschenwerkes des Molekulargerüsts infolge Kontraktion der Mizellen?) wird die Diffusion des größeren Ions, des Cl^- -Ions, mehr behindert als die des Na^+ -Ions. Dieser Befund müßte jedoch durch weitere Untersuchungen noch gestützt werden, da die Bestimmung des U_k/U_a -Wertes bei der gegebenen Membran nicht so gut reproduzierbar ist.

Das Verfahren sollte nun auch auf eine biologische Membran übertragen werden, wobei die Bedeutung der Meßgrößen A und U bereits erörtert wurde. Es wurde das Froschperikard gewählt, das sich im Mikroskop als einschichtige Bindegewebsmembran mit einzelnen Zellkernen, Melanophoren und Fibrillen zu erkennen gibt. In Übereinstimmung mit MANECKE, jedoch unabhängig von diesem, konnte ich am Perikard eine Kationenselektivität mit einem A -Wert von 0,001 bis 0,005 Mol/l feststellen.

Diese Eigenschaft bleibt auch nach Formaldehydbehandlung unverändert. Bei der einen Membran trat vor und nach HCHO -Einwirkung kein Siebeffekt auf, bei der anderen stellte ich im unbehandelten Zustand einen solchen fest ($U = 0,85$). Durch Formaldehydeinwirkung war jedoch dieser Siebeffekt verloren gegangen. U entsprach wieder dem Wert für die freie NaCl -Lösung. Die Formalinwirkung stellt hier einen Eingriff in das physiologische Geschehen dar. Man kann diesen Befund deshalb erst deuten, wenn man genauer über die biologische Struktur der Membran sowie über die Wirkungsweise des Formaldehyds unterrichtet ist.

Zusammenfassung.

Es wurde an Hand von Membranpotentialmessungen untersucht, welchen Einfluß der Gerbeffekt des Formaldehyds auf die Selektivität der Gelatinemembran sowie des Froschperikards ausübt. Den Versuchen lag die Theorie von MEYER und TEORELL zugrunde.

Die unbehandelte Gelatinemembran zeigte, der Theorie entsprechend, am I.P. keine Selektivität. Der Beweglichkeitsquotient von An- und Kationen innerhalb der Gelatinemembran entsprach dem der freien Lösung, was auf das Fehlen einer Siebwirkung schließen läßt.

Durch Einwirkung von Formaldehyd wurde bei der sauren Gelatine die Anionen- in die Kationenselektivität umgewandelt. Dieser Effekt zeigte sich an der mit HCl angesetzten Gelatine stärker als an der mit H_2O angesetzten, während eine der Formaldehydkonzentration parallele gehende Wirkung nicht festgestellt werden konnte. In Lösungen vom pH 3,2 wurde die durch den Formalineinfluß kationenpermeable Membran wieder anionenpermeabel.

An der alkalischen Gelatinemembran konnte das Verfahren nicht mit Erfolg angewandt werden.

Bei allen Formalinversuchen konnte an der Veränderung des Beweglichkeitsquotienten ein mit der Dauer der Einwirkung zunehmender Siebeffekt erkannt werden.

Das Froschperikard war kationenpermeabel und änderte nach Formaldehydeinwirkung seine Selektivität nicht, jedoch wurde in einem Falle ein bestehender Siebeffekt durch die Gerbung aufgehoben.

Literatur.

- BOHLMANN: Biochem. Z. **137**, 290 (1944). — FRENCH, D., and J. T. EDSALL: Adv. Protein Chem. II **278** (1945). — FUJITA, AKIJI: Biochem. Z. **162**, 245 (1925). — JUNG, F.: Unveröffentlicht. — LANDSBERG, R.: Z. physik. Chem. **197**, 256 (1951). — MANECKE, G.: Z. Naturforsch. 8b, 285 (1953). — MEYER, K. H., u. C. FERRI: Pflügers Arch. **238**, 78 (1937). — MEYER, K. H.: Helvet. chim. Acta **23**, 795 (1943); **28**, 962 (1945). — MEYER, K. H., u. H. MARK: Makromolekulare Chemie (1950). — MICHAELIS, L., u. P. RONA: Praktikum d. physik. Chem. 4. Aufl. 1931. — SCHELER, W., u. F. JUNG: Biochem. Z. (im Druck). — TEORELL, T.: Z. Elektrochem. **55**, 460 (1951). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **33**, 282 (1935/36). — WILBRANDT, W., H. RYSER and P. N. WITT: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 469 (1952). — WILBRANDT, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 9 (1950).

Prof. Dr. F. JUNG, Berlin NW 7, Clara-Zetkin-Str. 94.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. MATTHES).

Über die Blutdruck- und Flußänderungen in der Arteria carotis communis und Aorta ascendens nach Arterenol und Adrenalin sowie deren Beeinflussung durch Regitin.

Von

H. A. DITTMAR, K. MECHELKE und E. NUSSER.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. März 1954.)

Der Nachweis der sympathicolytischen Wirkung einer Substanz wurde unseres Wissens bisher vor allem mit Hilfe der vergleichenden Auswertung von Adrenalin- und Arterenol-Einzelinjektionen vor und nach Gabe des Sympathicolyticums durchgeführt.

GROSS, TRIPOD u. MEIER⁶ finden mit dieser Versuchsanordnung beim Regitin eine Abschwächung oder Aufhebung der Arterenoldruckwirkung sowie eine Drucksenkung nach Adrenalingabe. Darüber hinaus konnten sie feststellen, daß Regitin die nach Adrenalin und Arterenol auftretenden Einschränkungen der Durchblutung abschwächt oder aufhebt, während die, vor allem bei bestimmter Adrenalin dosierung beobachteten Durchblutungszunahmen kaum vermindert werden. In Katzen- und Rattenversuchen wird die stärkere Regitinwirkung auf die Adrenalinblutdruckerhöhung im Vergleich zur Arterenoldrucksteigerung festgestellt^{5, 6}.

JOHNSON, GREEN u. LANIER⁸ zeigen bei Untersuchungen der Haut- und Muskeldurchblutung am Hund, daß Regitin die vasokonstriktorischen Arterenoleffekte erst bei wesentlich höherer Dosierung vermindert, im Vergleich zur Aufhebung der gefäßverengenden Adrenalinwirkung. Auch bei Untersuchungen an isolierten Rattenherzen (Schlagfrequenz, Herzvolumen, Hubhöhe) wird von SERIN¹⁸ für das Sympathicolyticum Dibenamin eine geringere Beeinflussung des Arterenoleffektes nachgewiesen.

Bei gesunden Menschen tritt nach Regitin eine Abschwächung oder Aufhebung der Arterenoldruckwirkung ein, während nach Adrenalin eine Drucksenkung resultiert^{1, 7}. Diese sympathicolytische Wirkung wird klinisch zur Differentialdiagnostik der Hypertonie bei Phäochromozytomkranken angewendet. SACK u. BERNSTEIN¹⁷ deuten an, daß bei Verwendung von Benzodioxan als Testsubstanz bei Phäochromozytomkranken, der eintretende Druckabfall möglicherweise die Unterscheidung einer arterenolbedingten Hypertonie von einer durch Adrenalinsekretion hervorgerufenen Drucksteigerung erlaube. Die Vermutung basiert auf der geringeren Beeinflussbarkeit der Arterenoldrucksteigerung durch Benzodioxan. PITCAIRN u. YOUNG¹⁵ zeigten in 3 Hundeversuchen, daß Dibenamin die bei Arterenoldauerinfusion eintretende Drucksteigerung weniger stark vermindert im Vergleich zur Druckerhöhung bei Adrenalininfusion. Die Autoren weisen auf die Abhängigkeit der Dibenamin drucksenkung vom Adrenalin- oder Arterenolgehalt der exstirpierten Phäochromozytome hin. Beim „Arterenol-Phäochromozytom“ tritt nach Dibenamin eine geringe Drucksenkung auf.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir von der Frage aus, ob eine unterschiedliche sympathicolytische Wirkung des Regitins nachweisbar ist, wenn man dieses Pharmakon während einer Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion verabfolgt. Vergleichend wurden die Änderungen von Blutfluß und Blutdruck bei Dauerinfusion von Adrenalin und Arterenol vor und nach Regitgabe untersucht.

Methodik.

1. *Angewandte Instrumente.* Der Blutdruck wurde im abführenden Schenkel des Flußmeters mit einem Quecksilbermanometer üblicher Bauart registriert. Der rechte Vorhofdruck wurde photographisch mit einem Strain Gauge-Manometer aufgezeichnet. Die Druckübertragung erfolgte mittels eines Polyäthylenkatheters, welcher durch die Vena jugularis externa dextra in die Höhe des Vorhofes geschoben wurde. Die Flußmessung erfolgte mit dem Density-Flowmeter nach DAWES, MOTT u. VANE³. Der elektronische Teil des Instrumentes wurde geändert, um ohne Batterie arbeiten zu können. Die Anpassung der Schaltzeit des Flußmeters an die Flußgröße erreichten wir mittels variabler Meßintervalle.

Wir verwendeten 2 Instrumente verschiedener Größe. Das für die Carotis hatte bei der gewählten Einstellung des Ordinatenschreibers eine Meßkapazität von 100 cm³/min, das für die Aorta eine von 640 bzw. 1150 cm³/min. Die Registrierung des Flusses erfolgte mit dem Ordinatenschreiber nach HEUWING und BRAUN. Die Dauerinfusionen wurden mit dem Infusionsgerät der Firma B. Braun, Melsungen, ausgeführt. Die Infusionsmenge betrug 0,5 cm³/min. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß diese Infusionsmenge innerhalb des für die Konstanz von Druck und Fluß gefundenen Zeitraums keine Veränderungen hervorruft. Die Infusionen und Injektionen erfolgten bei Registrierung des Carotisflusses in die Vena jugularis externa sinistra, bei der Messung des Aortenflusses in den abführenden Schenkel des Flußmeters. Wir verwendeten das Arterenolpräparat Aktamin. Da wir mit dem Aortenfluß das Minutenvolumen abzüglich der Coronardurchblutung erfassen, haben wir ergänzend den Strömungswiderstand berechnet nach der Formel:

$$W = \frac{P_m \cdot 1221}{\text{Fluß/sec}} \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5}.$$

Die Operationsdauer bis zum Arbeiten des Gerätes betrug für Carotisversuche 13 min und für die Aortenexperimente 35 min vom Beginn der Narkose an gerechnet. Der Operationstisch wurde durch eine automatisch regelnde Heizplatte erwärmt.

Die Konstanz von Druck und Fluß ist in der Carotis (5 Versuche) für die Zeitspanne von 75—175 min und für die Aorta (3 Versuche) von 45—75 min sichergestellt. Im zu- und abführenden Schenkel des Flußmeters ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen des Druckes und eine Gleichsinnigkeit des Druckverlaufes. Im Durchströmungsversuch erzeugte ein Druck von 5 mm Hg beim kleinen Instrument einen Fluß von 210 cm³/min (entspricht 14 dyn · sec · cm⁻⁵). Für das große Instrument ergab sich: 5 mm Hg — 640 cm³/min — 6 dyn · sec · cm⁻⁵.

2. *Operationsvorgang.* Katzen von etwa 2,6 kg wurden mittels Chloräthyl und Äther narkotisiert. Nach Einbinden einer Venenkanüle wurden 60 mg/kg Chloralose infundiert und eine Trachealkanüle eingelegt. 24 Std vorher erhielten die Tiere keine Nahrung. Die rechte Arteria carotis communis wurde freigelegt, an beiden Enden abgeklemmt und die Kanüle des Instrumentes eingebunden. Vor dem Einbinden wurden 10 mg/kg Heparin injiziert. Das Einführen des Flußmeters in die

Aorta erfolgte nach der von BARER u. NUSSER² für die Pulmonalis angegebenen Technik zwischen die Aortenklappen und den Truncus brachiocephalicus. Die Unversehrtheit der Klappen war in jedem Versuch gewährleistet.

Ergebnisse.

I. Fluß- und Druckänderungen in der Arteria carotis communis.

1. *Dauerinfusion kleiner Adrenalindosen (0,25—6 γ /kg/min). 11 Versuche.* Während der Infusion von 0,25 γ /kg/min tritt eine kontinuierliche Flußzunahme bei gleichzeitiger geringer Drucksenkung ein. Nach Absetzen der Infusion nimmt der Fluß ab und der Druck steigt an. Bei Dauerinfusionen mit höherer Dosierung (0,5—6 γ /kg/min) wird dagegen ein kontinuierlicher Druckanstieg bei Flußabnahme festgestellt.

Tabelle 1. *Adrenalininfusionen (0,25 γ /kg/min — 6 γ /kg/min); Mittelwerte der Fluß- und Druckänderungen.*

(Es wurden die Zeitabschnitte der optimalen Flußänderungen ausgewertet.)

Sec. p. inj.	Druck % mm Hg	Fluß % ml/min	Anzahl der Versuche u. Dosierung
780—810	100 = 145 96	100 = 20 156	5 Versuche $\frac{1}{4}$ γ /kg/min
240—270	100 = 125 109	100 = 18 73	2 Versuche $\frac{1}{2}$ γ /kg/min
270—300	100 = 127 110	100 = 21 57	2 Versuche 1 γ /kg/min
240—270	100 = 140 118	100 = 18 43	1 Versuch 2 γ /kg/min
210—240	100 = 130 117	100 = 17 40	1 Versuch 6 γ /kg/min

2. *Dauerinfusion kleiner Arterenoldosen (0,25—1,0 γ /kg/min). 21 Versuche.* Im Gegensatz zu Adrenalin tritt während der Dauerinfusion von 0,25 γ Arterenol/kg/min keine Zunahme des Flusses, sondern eine Abnahme desselben bei geringer Druckerhöhung auf. Als Nebenfund werden in 2 Versuchen während der Infusion rhythmische, atemunabhängige Blutdruckschwankungen beobachtet, die mit Flußunregelmäßigkeiten einhergehen. Während der kontinuierlichen Flußabnahme konnten wir in 3 Versuchen eine spontan eintretende Flußzunahme bei eben nachweisbarem Druckabfall feststellen (Abb. 1). Bei einer Erhöhung der Infusionsdosis treten früher ausgeprägtere Druckänderungen auf bei wenig abweichendem Flußverhalten.

3. *Adrenalindauerinfusion von 25 γ /kg/min und Beeinflussung der Druck- und Flußveränderungen durch 0,6 mg Regitin. 5 Versuche.* Während des unmittelbar nach Infusionsbeginn eintretenden Druckanstieges wird eine vorübergehende Flußzunahme beobachtet, welche in eine kontinuierlich zunehmende Flußabnahme übergeht. Mit längerer Infusionsdauer fällt der Druck von seinem Höchstwert langsam etwas ab bei

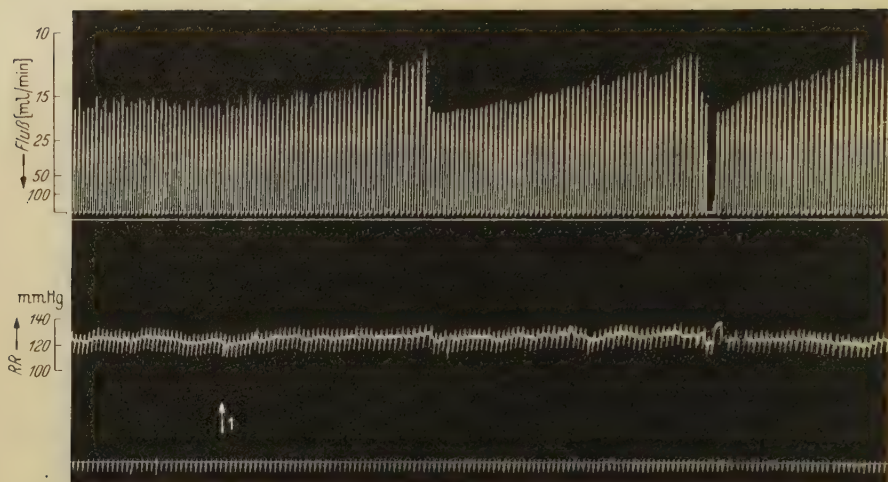


Abb. 1. Fluß- und Druckregistrierung in der Arteria carotis communis. Während der Arterienol-Dauerinfusion (0,25 γ /kg/min) treten mehrfach spontane Flußzunahmen bei eben nachweisbarer Druckabnahme auf. Gleichzeitig wird deutlich, daß mit zunehmender Infusionsdauer der Fluß kontinuierlich abnimmt, bei nahezu gleichmäßig gering erhöhtem Blutdruck. 1 Beginn der Infusion. Zeitschreibung: 5 sec.

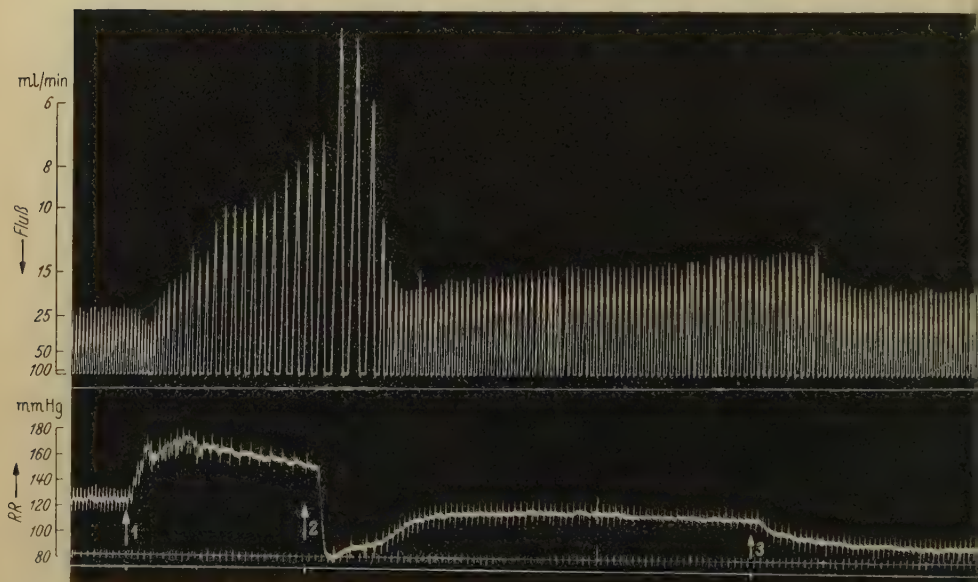


Abb. 2. Fluß- und Druckänderungen in der Arteria carotis communis nach Arterienoldauerinfusion (25 γ /kg/min) und deren Beeinflussung durch Regitin (0,6 mg). Zeitschreibung: 10 sec. — Nach Infusionsbeginn (1) tritt mit Druckanstieg eine kurzfristige Flußzunahme auf, die in eine kontinuierliche zunehmende Flußzunahme übergeht. Nach Regitin (2) erfolgt bei abrupter Drucksenkung eine weitere Flußabnahme vor der anschließenden beträchtlichen Flußzunahme. Bei Fortsetzung der Infusion treten nur geringe Fluß- und Druckänderungen auf. Nach Infusionsende (3) sinkt der Druck ab und der Fluß nimmt zu.

weiterer Flußverminderung. Nach der Regitingabe — bei erheblich vermindertem Fluß und gegenüber seinem Ausgangswert deutlich erhöhtem Druck — nimmt bei abrupter Drucksenkung der Fluß kurzfristig weiter ab. Während des anschließenden geringen Blutdruckanstieges erfolgt eine schnell eintretende beträchtliche Flußzunahme. Bei Fortsetzung der Infusion wird eine erneute kontinuierliche Flußverminderung bei geringem weiteren Druckanstieg beobachtet.

4. *Arterenoldauerinfusion von 25 γ /kg/min und Beeinflussung der Druck- und Flußveränderungen durch 0,6 mg Regitin. 6 Versuche.* Es werden gleichsinnige Fluß- und Druckänderungen wie bei der Adrenalininfusion festgestellt (Abb. 2). Die Mittelwerte der Fluß- und Druckänderungen zeigen, daß nach Regitin während der Adrenalininfusion ein größerer Druckabfall eintritt (Tab. 2). Bei Fortsetzung der Adrenalin-

Tabelle 2. *Mittelwerte der Druck- und Flußänderungen nach Adrenalin-Dauerinfusion und deren Beeinflussung durch Regitin (5 Versuche).*

Sec. p. inj.	Druck % 100% = 135 mm Hg	Fluß % 100% = 19 ml/min	Adrenalininfusion 25 γ /kg/min
6—37	135	139	größter Fluß
60—90	155	56	höchster Druck
270—300	144	41	kleinster Fluß
Sec. nach Regitin			kontinuierliche Fortsetzung der Infusion + 0,6 mg Regitin (Regitininj. in 2 sec)
0—30	121	28	kleinster Fluß
20—50	65	50	niedrigster Druck
50—80	111	85	größter Fluß

Mittelwerte der Druck- und Flußänderungen nach Arterenol-Dauerinfusion und deren Beeinflussung durch Regitin (6 Versuche).

Sec. p. inj.	Druck % 100% = 140 mm Hg	Fluß % 100% = 20 ml/min	Arterenolinfusion 25 γ /kg/min
15—45	116	123	größter Fluß
60—90	156	73	höchster Druck
260—290	141	45	kleinster Fluß
Sec. nach Regitin			Arterenoldauerinfusion 25 γ /kg/min + 0,6 mg Regitin
10—40	122	41	kleinster Fluß
30—60	77	49	niedrigster Druck
90—120	89	89	größter Fluß

infusion resultiert bei nahezu übereinstimmenden Flußänderungen ein deutlicher Wiederanstieg des Blutdruckes über seinen Ausgangswert. Bei der Arterenolinfusion verbleibt der Druck unter seinem Ausgangswert.

Nach Adrenalin-Einzelinjektion (25 γ , 12 Versuche) tritt bei ansteigendem Blutdruck eine kurzdauernde deutliche Flußzunahme auf (Abb. 3). Während der optimalen Blutdruckerhöhung erfolgt eine zunehmende Flußverminderung. Mit Wiederaufstieg des Blutdrucks kommt es zur Flußverbesserung.

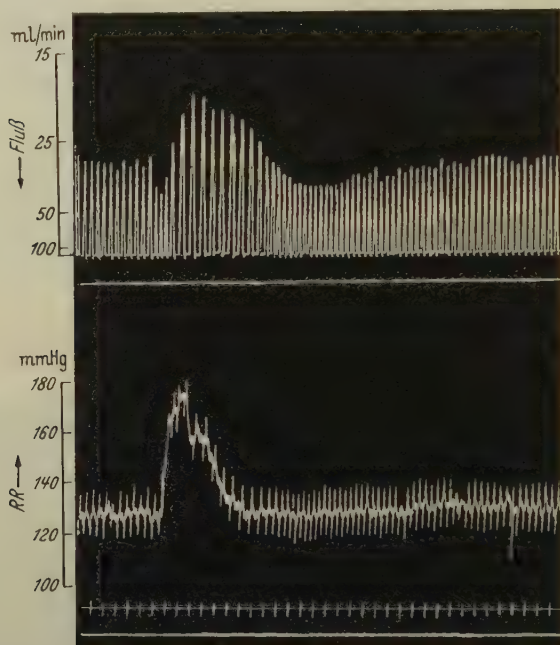


Abb. 3. Druck- und Flußregistrierung in der Arteria carotis communis. Einzelinjektion: 25 γ Adrenalin. Zeitschreibung: 10 sec.

Nach Arterenol-Einzelinjektion (25 γ , 7 Versuche) wird im Vergleich zu Adrenalin ein größerer Druckanstieg beobachtet (Abb. 4). Der Druck fällt später auf seinen Ausgangswert ab bei noch stärker vermindertem Fluß.

II. Änderungen des Aortenflusses und des Blutdruckes.

1. Dauerinfusion von 25 γ Adrenalin/kg/min und deren Beeinflussung durch 0,6 mg Regitin. 9 Versuche. Die bei Registrierung in der Arteria carotis unmittelbar nach Infusionsbeginn beobachtete anfängliche Flußzunahme wurde nicht festgestellt. Es kommt sofort zu einer Druckerhöhung und Aortenflußabnahme. Gleichzeitig mit der optimalen Flußabnahme wird der höchste Wert des Strömungswiderstandes errechnet (Tab. 3). Die Regitingabe unterbricht eine weitere kontinuierliche Flußabnahme. Vor der optimalen Drucksenkung erreicht die eintretende Flußzunahme ihren Höchstwert.

2. Dauerinfusion von 25 γ Arterenol/kg/min und deren Beeinflussung durch 0,6 mg Regitin. 11 Versuche. Die Abb. 5 zeigt, daß während der

Arterenolinfusion eine Flußabnahme und eine Druckerhöhung auftritt. Nach Regitin nimmt der erheblich verminderte Fluß über den Ausgangswert zu, bei gleichzeitigem abrupten Druckabfall. Bei kontinuierlicher Fortsetzung der Arterenoldauerinfusion tritt bei geringem Wiederanstieg des Druckes nur eine unbedeutende, erneute Aortenflußabnahme auf. Nach Absetzen der Dauerinfusion nimmt der Fluß ab und der Blutdruck sinkt.

Die Tab. 3 zeigt, daß Regitin die Fluß- und Druckänderungen in der Aorta ascendens, welche während der Adrenalin- und Arterenol-Dauerinfusion (25 γ /kg/min) auftreten, gleichsinnig beeinflusst. Nach Adrenalininfusion tritt in kürzerer Zeit eine größere prozentuale Flußabnahme ein. Bei der Arterenolinfusion bewirkt Regitin einen geringeren prozentualen Druckabfall.

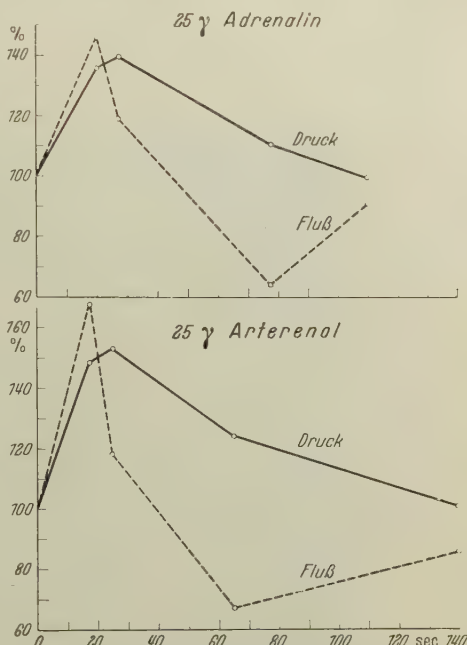


Abb. 4. Mittelwerte der Druck- und Flußänderungen in der Arteria carotis communis sinistra nach 25 γ Adrenalin- und Arterenolinjektion. Abszisse: Zeit in sec. Ordinate: Prozentuale Änderungen.

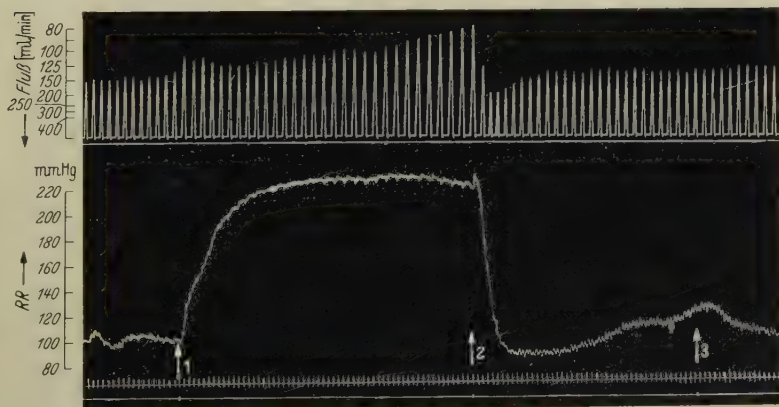


Abb. 5. Druck- und Aortenflußänderungen. 1 u. 3 Arterenolinfusion 25 γ /kg/min. 2 Regitin 0,6 mg. Zeitschreibung: 5 sec.

Tabelle 3. *Mittelwerte der Druck- und Flußänderungen nach Adrenalininfusion und deren Beeinflussung durch Regitin (9 Versuche).*

Sec. p. inj.	Druck % 100% = 125 mm Hg	Fluß % 100% = 160 ml/min	Str. W. % 100% = 510 $\frac{\text{dyn sec}}{\text{cm}^5}$	
60—90	198	48	408	höchster Druck
75—105	187	38	480	kleinster Fluß, gleichzeitig größter Strömungswiderstand
Sec. nach Regitin				kontinuierliche Fortsetzung der Adrenalininfusion 25 γ /kg/min + 0,6 mg Regitin
15—30	88	126	76	größter Fluß
30—60	66	110	60	niedrigster Druck, gleichzeitig kleinster Strömungswiderstand

Mittelwerte der Druck- und Flußänderungen nach Arterenolinfusion und deren Beeinflussung durch Regitin (11 Versuche).

Sec. p. inj.	Druck % 100% = 130 mm Hg	Fluß % 100% = 155 ml/min	Str. W. % 100% = 490 $\frac{\text{dyn sec}}{\text{cm}^5}$	
150—180	203	54	425	höchster Druck
210—270	200	48	526	kleinster Fluß, größter Strömungswiderstand
Sec. nach Regitin				kontinuierliche Fortsetzung der Arterenolinfusion 25 γ /kg/min + 0,6 mg Regitin
15—30	114	135	81	größter Fluß
30—60	86	114	73	niedrigster Druck, kleinster Strömungswiderstand

Die Tatsache, daß die während der Arterenolinfusion eintretende Flußabnahme und Druckerhöhung nach Absetzen derselben sich spontan normalisieren, wird durch Abb. 6 belegt.

Wiederholt man nach Absetzen der Adrenalin- oder Arterenolinfusionen — bei welchen während der Infusion Regitin gespritzt wurde — nochmals eine Dauerinfusion mit den gleichen Pharmaka, so sieht man, daß immer eine kontinuierliche Flußzunahme und Druckerhöhung auftritt (Abb. 7). Auch bei längerer Dauer der „zweiten Arterenolinfusion“

erfolgt keine erneute Flußabnahme, im Gegensatz zur „zweiten Adrenalininfusion“, bei welcher nach anfänglicher Flußzunahme eine erneute langsame Flußabnahme resultiert. Die Tab. 4 zeigt, daß nach den „zweiten Arterenolinfusionen“ ein stärkerer Druckanstieg und eine größere Flußzunahme eintritt im Vergleich zu den „zweiten Adrenalininfusionen“.

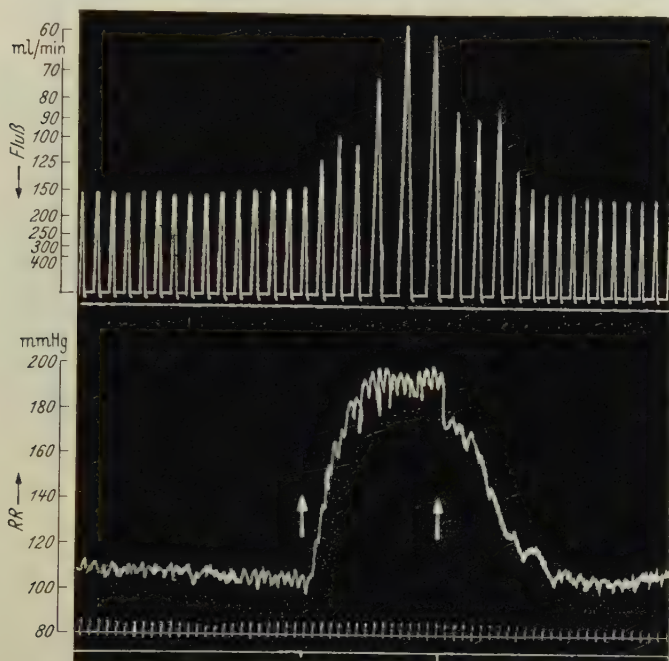


Abb. 6. Druck- und Aortenflußänderung. ↑ Arterenolinfusion 25 γ /kg/min. Zeitschreibung: 5 sec.

Tabelle 4. Mittelwerte der optimalen Druck- und Flußzunahme während der „zweiten Adrenalin- und Arterenolinfusionen“ (je 25 γ /kg/min).

Druck % 100% = 80 mm Hg	Fluß % 100% = 130 ml/min	Str. W. % 100% = 380 $\frac{\text{dyn sec}}{\text{cm}^5}$	
201	147	142	3 Versuche Arterenol
171	128	129	4 Versuche Adrenalin

Nach Regitin-Einzelinjektionen (11 Versuche) 0,6 mg tritt 22–45 sec nach Injektionsende eine mittlere optimale Flußzunahme von 142% (100% = 185 cm^3/min) bei einer mittleren Drucksenkung von 67% (100% = 150 mm Hg) auf. Während der größten Flußzunahme wurde der niedrigste Strömungswiderstand mit 47% festgestellt (100% = 620 Einh.). Im Anschluß an diese Veränderungen kommt es zu einer langsamen Flußabnahme, die den Ausgangswert unterschreitet. Der Druck steigt nicht auf den vor der Injektion bestehenden Wert an.

3. Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion nach vorheriger Regitingabe von 0,6 mg; Arterenol (7 Versuche), Adrenalin (5 Versuche), je 25 γ /kg/min. Die Abb. 8 zeigt die sofort nach Regitingabe gleichzeitig eintretende

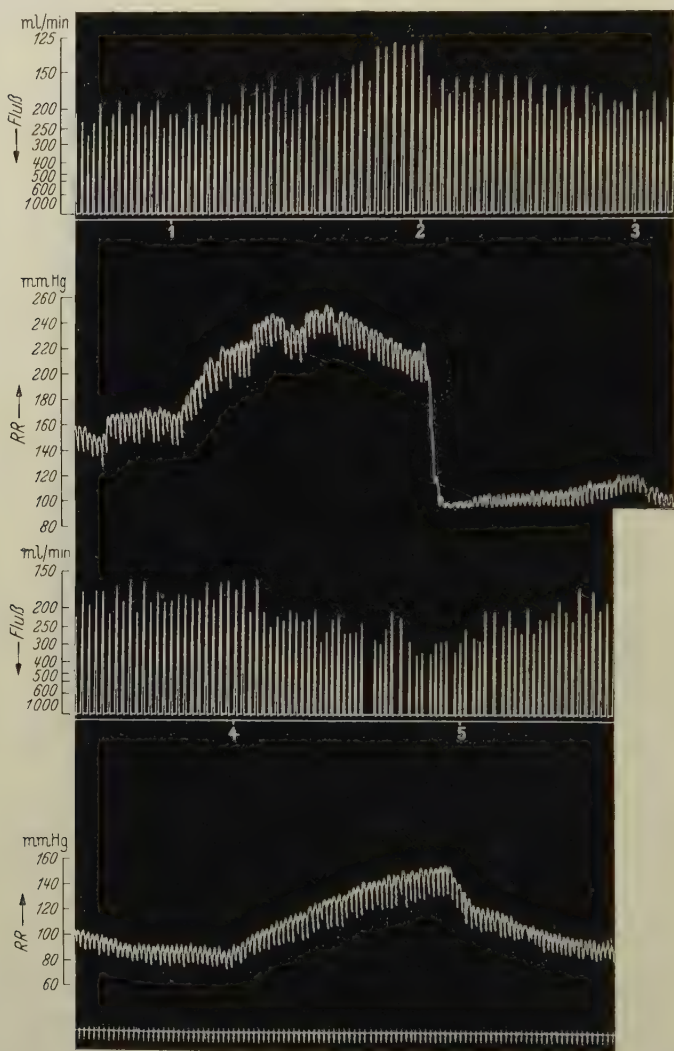


Abb. 7. Druck- und Aortenflußänderungen. 1 u. 3 Arterenolinfusion 25 γ /kg/min. 2 Regitin 0,6 mg. 4—5 Arterenolinfusion 25 γ /kg/min. Zeitschreibung: 5 sec.

Flußzunahme und abrupte Drucksenkung sowie die anschließende Flußabnahme bis unter den Ausgangswert bei anhaltend vermindertem Druck. Mit Arterenolinfusionsbeginn nehmen Druck und Fluß kontinuierlich zu.

Nach Absetzen der Infusion sinkt der Druck bei gleichzeitiger Flußminderung.

Diese Befunde werden in den weiteren Versuchen bestätigt. Betrachtet man die Mittelwerte der Druck-, Fluß und Widerstandsänderungen — Mittelwerte vor Infusionsbeginn 100% angenommen — die bei Adrenalin- und Arterenolinfusionen nach vorheriger Regitingabe auftreten, so sieht

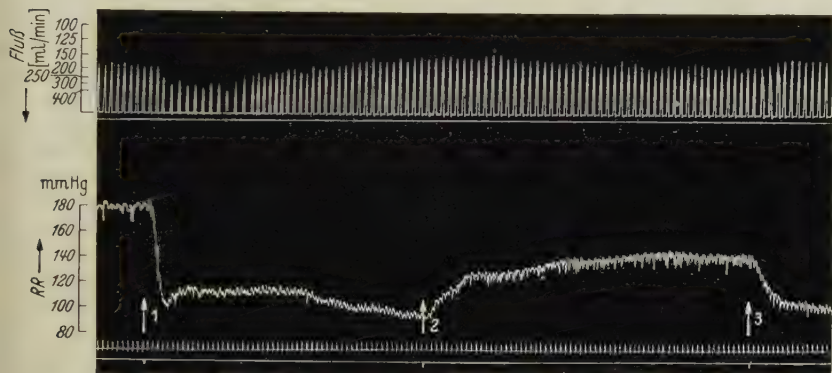


Abb. 8. Druck- und Aortenflußänderungen. 1 0,6 mg Regitin. 2 u. 3 Arterenolinfusion 25 μ /kg/min. Zeitschreibung: 5 sec.

man nach Arterenol einen stärkeren Wiederanstieg des Druckes bei ausgeprägter Flußzunahme (Tab. 5). Während bei der Arterenolinfusion ein kontinuierlicher Druckanstieg eintritt, sieht man nach Adrenalin bei längerer Infusionsdauer einen geringen Wiederabfall des Druckes und eine erneute geringe Flußabnahme.

Tabelle 5. Mittelwerte der optimalen Druck- und Flußzunahme

a) während der Infusion von 25 μ /kg/min Adrenalin nach vorheriger Regitingabe 0,6 mg. 5 Versuche.

Druck	Fluß	Widerstand
100% = 87 mm Hg	100% = 120 ml/min	100% = 580 $\frac{\text{dyn} \cdot \text{sec}}{\text{cm}^5}$
152	132	114

b) während der Infusion von 25 μ /kg/min Arterenol nach vorheriger Gabe von 0,6 mg Regitin. 7 Versuche.

Druck	Fluß	Widerstand
100% = 91 mm Hg	100% = 125 ml/min	100% = 560 $\frac{\text{dyn} \cdot \text{sec}}{\text{cm}^5}$
196	143	144

Besprechung der Ergebnisse.

Die nach Adrenalin und Arterenol eintretenden Blutdruckänderungen ermöglichen eine vergleichende Betrachtung der Wirksamkeit dieser Stoffe. Während nach Arterenol immer eine Blutdruckerhöhung resultiert, wirken Adrenalin Dosen unter $0,5 \gamma/\text{kg}$ blutdrucksenkend. Nach Arterenol wird im Vergleich zu Adrenalin eine stärkere und länger anhaltende Drucksteigerung festgestellt.

Während die Ergebnisse der Druckänderungen übereinstimmen, werden bei Prüfung der Durchblutung verschiedener Gefäßgebiete abweichende Befunde mitgeteilt. In Hundeversuchen wurde bei Registrierung der Durchblutung in der Carotis communis mit der Thermostromuhr nach blutdrucksteigernden Dosen von Adrenalin (über $0,25 \gamma/\text{kg}$ i.v.) eine Zunahme des Flusses festgestellt, die von REIN¹⁶, KAHLSON u. MERTENS⁹ als druckpassiver Effekt gedeutet wird. Mit gleicher Methode findet DÖRNER⁴ nach Adrenalin ($1 \gamma/\text{kg}$ i.v.) einen geringen Druckanstieg bei Abnahme des Flusses. Während der i.v. Infusion mit geringer Adrenalin-dosis ($0,25 \gamma/\text{kg}/\text{min}$) tritt eine Flußzunahme bei gleichbleibendem Druck auf (KAHLSON u. MERTENS⁹). Messungen der Carotisdurchblutung mit dem Rotameter zeigen, daß nach 25γ Adrenalin i.v. eine rasche initiale Flußzunahme eintritt, welche in eine Flußabnahme übergeht. Arterenolgaben gleicher Dosierung hatten eine sofortige, länger anhaltende Flußabnahme zur Folge (ZANETTI u. OPDYKE¹⁹).

Die Durchblutung der Femoralis nimmt nach Adrenalingaben in Dosen bis $0,25 \gamma/\text{kg}$ i.v. zu, bei gleichbleibendem oder gering gesenktem Blutdruck (MERTENS, REIN u. VALDECASAS¹⁴ [Hundeversuche], GROSS⁵ [Katzenversuche]). Nach intraarterieller Gabe von $0,01$ – $0,1 \gamma/\text{kg}$ wird der gleiche Befund erhoben (GROSS⁵ [Katze]). DÖRNER⁴ berichtet von Hundexperimenten über wechselndes Verhalten der Durchblutung bei gleicher Versuchsanordnung. Untersuchungen von LANIER¹¹ (Hundeversuche) mit dem elektromagnetischen Flußmeter von RICHARDSON zeigen, daß nach $1 \gamma/\text{kg}$ Adrenalin i.v. eine kurzfristige Flußabnahme mit nachfolgender Flußzunahme eintritt. ZANETTI u. OPDYKE¹⁹ (Hundeversuche) finden mit dem Rotameter nach $25 \gamma/\text{kg}$ Adrenalin eine mit Druckanstieg auftretende initiale Flußzunahme, welche in eine Flußabnahme übergeht. Nach 1 – $5 \gamma/\text{kg}$ Arterenol beobachteten KOBOLD u. VASS¹⁰ mit dem Bubbleflowmeter bei der Katze eine kurze initiale Flußzunahme und anschließende Flußabnahme. MEIER, GROSS und EICHENBERGER¹² (Thermostromuhr, Katzenversuche) sehen nach $2 \gamma/\text{kg}$ Arterenol i.v. eine Durchblutungszunahme. Bei Verwendung des elektromagnetischen Flowmeters stellen LANIER u. Mitarb.¹¹ nach 25γ Einzelinjektionen Arterenol eine Flußabnahme fest.

Nach blutdrucksteigernden Adrenalingaben wird von REIN¹⁶, KAHLSON u. MERTENS⁹ mit Hilfe der Thermostromuhr (Hund), welche den Fluß der Pulmonalis registriert, eine Minutenvolumenabnahme gefunden. Die Ergebnisse werden von MEIER, TRIPOD u. WIRZ¹³ (Kaninchen) mit gasanalytischen Methoden bestätigt. Diese Autoren zeigen, daß nach Arterenolgaben von 5 – $100 \gamma/\text{kg}$ eine stärkere Minutenvolumenabnahme im Vergleich zu Adrenalin resultiert.

Diese kurze Zusammenstellung wesentlicher Befunde der Adrenalin- und Arterenolwirkung zeigt, daß unsere Untersuchungen die vorliegenden Ergebnisse durch quantitative Angaben der Flußänderungen bei gleichzeitiger Blutdruckschreibung ergänzen. Wir beobachten während der Adrenalininfusion immer dann eine Flußabnahme, wenn gleichzeitig eine Drucksteigerung eintritt. Bei gleichbleibendem oder abnehmendem Druck sehen wir regelmäßig eine geringe Flußzunahme. Diese Befunde zeigen, daß bei kleinen Adrenalin Dosen vasodilatatorische Effekte auftreten,

während bei höherer Dosierung eine gefäßverengende Wirkung resultiert. Nach kleinen Arterenoldosen beobachten wir immer eine Abnahme der Durchblutung bei geringem Druckanstieg.

Zur Objektivierung der Regitinwirkung haben wir mit Arterenol- und Adrenalininfusionen einen Widerstandshochdruck ausgelöst. Bei der ausgeprägten Aortenflußabnahme und der starken Drucksteigerung ist eine Blutanschoppung in zentralen Gefäßgebieten anzunehmen. Die Aufhebung der vasokonstriktorischen Adrenalin- und Arterenoleffekte durchbricht plötzlich die Kreislaufzentralisation, so daß Blutdruck und Aortenfluß ihre Ausgangswerte unterschreiten. Eine quantitativ unterschiedliche Regitinwirkung auf die Kreislaufveränderungen der beiden Wirkstoffe wurde nicht festgestellt.

Eine besondere Erklärung ist für die Befunde notwendig, welche zeigen, daß nach vorheriger Regitingabe während der anschließenden Adrenalin- und Arterenolinfusion bei geringem Druckanstieg eine Aortenflußzunahme erfolgt. Auch bei einer „zweiten Adrenalin- und Arterenolinfusion“ — während der ersten Infusion der Wirkstoffe wurde Regitin verabfolgt — tritt bei geringer Druckerhöhung eine Zunahme des Aortenflusses auf. Es ist auffällig, daß dieser Befund besonders eindrucksvoll bei Arterenolgabe festgestellt wird, da nach Arterenol eine generalisierte Vasokonstriktion angenommen wird.

Wenn man bisher als charakteristisch für die sympathicolytische Wirkung einer Substanz die Blutdruckumkehr nach Adrenalin und die Aufhebung der Arterenoldrucksteigerung angesehen hat, so kann man nach unseren Dauerinfusionsergebnissen von einer Umkehrwirkung des Regitins auf den Aortenfluß bei Adrenalin und Arterenol sprechen. Die mit der Aortenflußzunahme auftretende Drucksteigerung ist geringer im Vergleich zu derjenigen, die bei Widerstandszunahme und abnehmendem Aortenfluß vor Regitin auftritt.

Gleichzeitig mit der Aortenflußzunahme und Druckerhöhung wird ein Anstieg des rechten Vorhofdruckes festgestellt (7 Versuche). Während der ersten Arterenolinfusion (vor Regitingabe) wird dagegen ein wechselndes Verhalten des rechten Vorhofdruckes beobachtet. In 2 Versuchen wurde bei Aortenflußabnahme und Blutdruckerhöhung eine Abnahme des rechten Vorhofdruckes gesehen, in weiteren 5 Versuchen eine Zunahme desselben gefunden.

Zusammenfassung.

Mit dem Density-Flowmeter nach DAWES, MOTT u. VANE³ wurden in der Arteria carotis communis und in der Aorta ascendens nach Adrenalin- und Arterenoleinzelinjektionen und Dauerinfusionen folgende Fluß- und Druckänderungen festgestellt:

1. Druck- und Flußänderungen in der Arteria carotis communis.

a) Der Fluß nimmt während der Dauerinfusion von 0,25 γ /kg/min Adrenalin zu bei gleichzeitiger geringer Drucksenkung. Mit höherer Dosierung wird ein Druckanstieg und eine Flußabnahme festgestellt.

b) Während der Arterenolinfusion von 0,25 γ /kg/min tritt eine Flußabnahme und eine geringe Druckerhöhung auf. Während der kontinuierlichen Flußabnahme wird mehrfach eine spontan eintretende Flußzunahme bei eben nachweisbarem Druckabfall gesehen.

c) Die Flußabnahme und Drucksteigerung, welche während der Adrenalin- und Arterenolinfusion mit 25 γ /kg/min auftritt, wird durch Regitin übereinstimmend quantitativ und qualitativ beeinflusst.

2. Druck- und Flußänderungen in der Aorta ascendens.

a) Regitin unterbricht in gleichem Ausmaß die während der Adrenalin- und Arterenolinfusion eintretende kontinuierliche Aortenflußabnahme und senkt schlagartig den Druck.

b) Wird im Anschluß an die Arterenol- und Adrenalininfusion, bei welcher Regitin verabfolgt wurde, nochmals eine „zweite Infusion“ mit dem gleichen Wirkstoff durchgeführt, so tritt bei geringerer Druckerhöhung eine Aortenflußzunahme auf. Gleichzeitig steigt der rechte Vorhofdruck an. Auch nach vorheriger Regitingabe wird bei anschließender Adrenalin- und Arterenolinfusion eine geringe Drucksteigerung und Aortenflußzunahme festgestellt.

Literatur.

- ¹ BERNSMEIER, A., H. ESSER u. B. LORENZ: Med. Klin. **1951**, 1236. — BERNSMEIER, A., H. ESSER u. J. BECKER: Z. exper. Med. **121**, 430 (1953). — BERNSMEIER, A., u. J. BECKER: Dtsch. Arch. klin. Med. **200**, 451, 464, 629, 639 (1953). — ² BARER, G., and E. NUSSER: J. of Physiol. im Druck. — ³ DAWES, G. S., J. C. MOTT and J. R. VANE: J. of Physiol. **121**, 50 (1953). — ⁴ DÖRNER, J.: Pflügers Arch. **257** 464 (1953). — ⁵ GROSS, F.: Helvet. physiol. Acta **7**, C'43—C'44 (1949). — ⁶ GROSS, F., I. TRIPOD u. R. MEIER: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 352. — GROSS, F., u. E. STRICKER: Helvet. physiol. Acta **8**, 358 (1950). — ⁷ HEINZEL, F., K. MATTHES, K. MECHELKE u. E. NUSSER: Cardiologia (Basel) **743** (1952). — ⁸ JOHNSON, H. H., H. D. GREEN and I. T. LANIER: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **108**, 144 (1953). — ⁹ KAHLSON, H., u. O. MERTENS: Pflügers Arch. **237**, 699 (1936). — ¹⁰ KOBOLD, A. F., and C. N. VASS: J. of Physiol. **120**, 105 (1953). — ¹¹ LANIER, I. T., H. D. GREEN, J. HARDAWAY, H. H. JOHNSON, W. B. DONALD: Circulation (New York) **1**, 40 (1953). — ¹² MEIER, R., F. GROSS u. E. EICHENBERGER: Helvet. physiol. Acta **7**, 230 (1949). — ¹³ MEIER, R., I. TRIPOD u. E. WIRZ: Helvet. physiol. Acta **7**, 210 (1949). — Arch. internat. Pharmacodynamie et de therap. **81**, 485 (1950). — ¹⁴ MERTENS, O., H. REIN u. G. VALDECASAS: Pflügers Arch. **237**, 454 (1936). — ¹⁵ PITCAIRN, D. M., and W. B. YOUNG: Circulation (New York) **2**, 505 (1950). — ¹⁶ REIN, H.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 1937. — ¹⁷ SACK, H., u. A. BERNSMEIER: Z. inn. Med. **5**, 152 (1950). — ¹⁸ SERIN, F.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **26**, 299 (1952). — ¹⁹ ZANETTI, M. E., and DAVID F. OPDYKE: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 107 (1953).

Dr. H. A. DITTMAR, Heidelberg, Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. MATTHES).

Über die Beeinflussung der bei Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion auftretenden Kreislaufveränderungen durch Regitin.

Von

H. A. DITTMAR, K. MECHELKE und E. NUSSER*.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1954.)

Die Schwierigkeit der differentialdiagnostischen Abgrenzung, der durch die Adrenalin- und Arterenolsekretion eines Phäochromozytoms bedingten Blutdruckerhöhung von Hypertonien, die durch andere Ursachen hervorgerufen werden, hat zur Ausarbeitung pharmakologischer Testverfahren geführt. Es soll entweder eine charakteristische Blutdruckkrise der Phäochromozytomkranken ausgelöst, oder bei bereits bestehender Dauerhypertonie ein erheblicher Blutdruckabfall erzielt werden. Es war daher naheliegend, als blutdrucksenkende Testpharmaka bei im Blut kreisenden adrenergischen Substanzen die Sympathicolytica zu verwenden. Bei experimentellen Untersuchungen am gesunden Menschen wurde festgestellt, daß das Regitin eine wirksame, sympathicolytische Wirkung besitzt im Gegensatz zu den Mutterkornalkaloiden^{6, 14, 24}. Regitin wird in zunehmendem Maße als Testsubstanz zur differentialdiagnostischen Klärung der Hypertonie verwendet^{3, 9, 10, 16, 17, 25, 26, 28, 32, 37}. Bei Operationen von Phäochromozytomkranken werden die Gefahren verhindert, die bei plötzlicher erheblicher Adrenalin- und Arterenolausschüttung auftreten können^{18, 19, 20, 21, 22, 36}.

Nach Regitingabe bleibt bei gesunden Menschen der für mittlere Adrenalin Dosen (25 γ) charakteristische primäre Blutdruckanstieg aus. Die blutdrucksenkende Adrenalinwirkung tritt deutlich hervor, die sekundäre Adrenalin drucksteigerung wird weitgehend abgeschwächt oder ist nicht mehr nachweisbar. Der blutdrucksteigernde Effekt des Arterenols dagegen wird durch Regitin weniger stark beeinflußt²⁴. Mit höherer Regitindosis kann man jedoch auch eine völlige Hemmung der Arterenol blutdruckwirkung erreichen. Eine Blutdrucksenkung tritt nach Arterenol bei vorheriger Regitingabe nicht auf⁶. Die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der Adrenalin- und Arterenol blutdruckwirkung durch Regitin am

* Unter Mitarbeit von cand. med. E. BERTHOLD.

gesunden Menschen ließ vermuten, daß auch bei Phäochromozytom-kranken der Regitintest in Zusammenhang mit den jeweils im Blute kreisenden Wirkstoffen bewertet werden muß.

In vorliegenden Untersuchungen soll geprüft werden, ob die experimentell mit einer Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion beim gesunden Menschen erzeugte Blutdruckerhöhung durch Regitingabe in unterschiedlicher Weise beeinflußt wird.

Methodik.

Der arterielle Blutdruck wurde mit einem Lilly-Kondensatormanometer, der Venendruck mit einem Strain Gauge-Manometer geschrieben. Pulsfrequenzschreibung sowie Registrierung des Volumens und der Sauerstoffsättigung am Ohr nach MATTHES, Pneumotachogramm nach HOCHREIN. Die Registrierung des Volumens und der Sauerstoffsättigung am Muskel (Durchleuchtung des Fußes) erfolgte (ähnlich der Methode von MATTHES am Ohr oder Finger) mit 2 elfstufigen Sekundärelektronenvervielfachern (SEV) der Fa. Dr. Georg Maurer, Nürtingen. Die Sekundärelektronenvervielfacherzellen (SEV) wurden mittels glimmlichtstabilisiertem Netzgerät hoher Konstanz betrieben.

Als Lichtquelle bei den Registrierungen diente eine batteriegespeiste 24 V 250 W-Lampe in einem Metallgehäuse, die Lichtaustrittsöffnung, die in der Höhe des Glühfadens der Lampe liegt, war als wassergekühlter Kondensor ausgeführt.

Die Regelung des Verstärkungsgrades der beiden SEV-Zellen erfolgte mit zwei die Zellenspannung variierenden Doppelpotentiometern für die Feineinstellung und einem Stufenschalter für die Grobvorwahl. Die Lichtstrahlen gelangen über einen Doppelkondensor ($f = 80$ mm) und ein verspiegeltes Prisma zu den Lichteintrittsöffnungen der SEV-Zellen. Vor der den ultraroten Strahlenanteil registrierenden Zelle befindet sich ein Ultrarotfilter Nr. 84 der Agfa, die Rotzelle arbeitet direkt. Aus den auf energiegleiches Spektrum bezogenen Frequenzkurven der beiden Zellen (die Rotzelle arbeitet bis $800\text{ m}\mu$ mit einem Maximum bei $650\text{ m}\mu$, die Ultrazelle mit Filter beginnt bei $740\text{ m}\mu$ mit einem Maximum bei $850\text{ m}\mu$) geht hervor, daß die Rotzelle noch einen geringen Anteil des langwelligen roten Spektrums mitregistriert. Diese an sich unerwünschte Erscheinung wird demnächst durch ein Filter behoben werden. Die Registrierung erfolgte mit zwei Ruhstrat Galvanometern SSG 11, die mit Serien- und Parallelwiderständen den Ausgängen der SEV angepaßt wurden. Wir arbeiteten mit Verstärkungsgraden von 10^4 bis 10^5 ohne Störungen durch Thermischen Dunkelstrom, der nach den Firmenangaben für die von uns verwendeten Typen zwischen 10^{-11} und 10^{-13A} liegen soll.

Bei Beginn der Registrierung wurden beide Zellen mit der Verstärkungsregulierung auf gleiche Empfindlichkeit eingestellt.

Ergebnisse.

1. Arterenoldauerinfusion $30\text{ }\gamma/\text{min}$, während der Infusion intravenöse Injektion von 20 mg Regitin (Anzahl der Versuchspersonen: 12)*. Wie Abb. 1 zeigt, tritt während der Arterenolinfusion ein systolischer und diastolischer Druckanstieg ein bei gleichzeitiger Verlangsamung der Herzschlagfolge. Mit der Druckerhöhung wird ein vermehrter Blutgehalt im Bereich des Fußes (obere Kurve) und eine Volumenabnahme am Ohr

* Der Fa. Schering AG. danken wir für Überlassung des Arterenol-Präparates Aktamin.

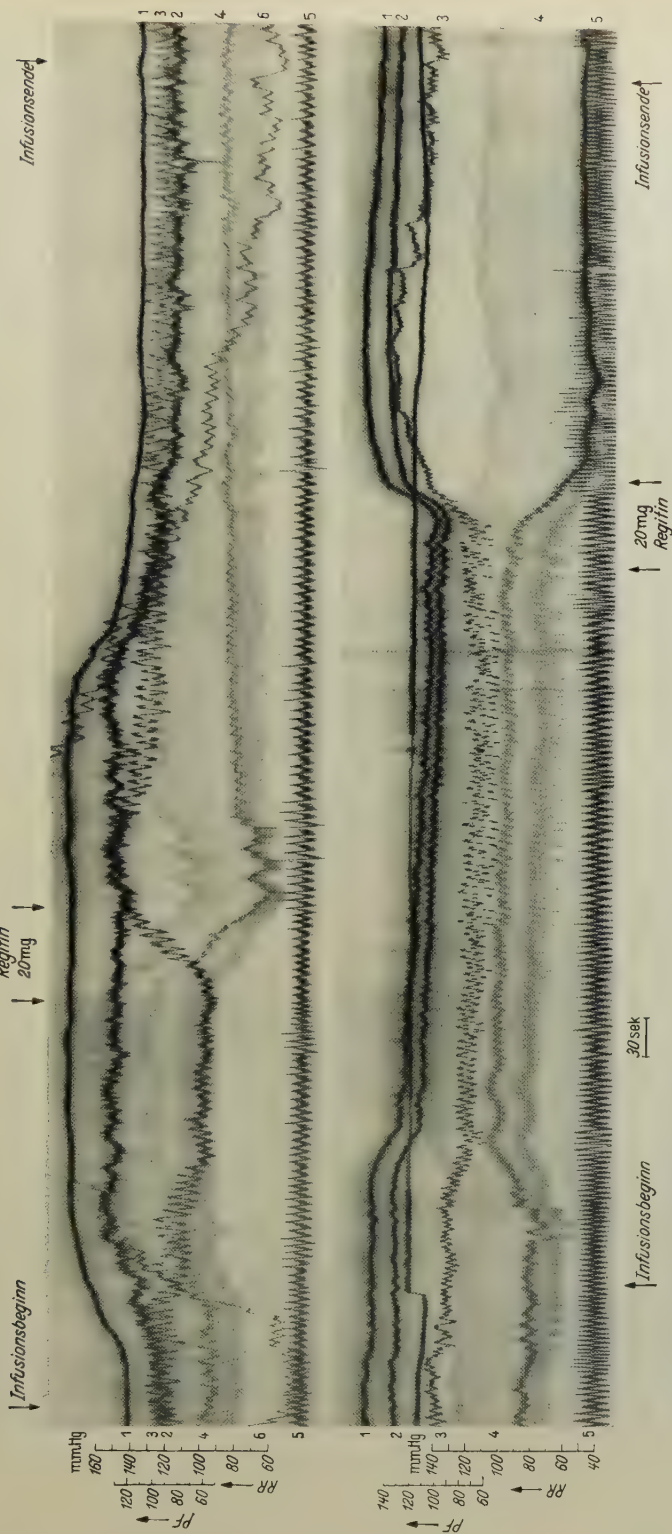


Abb. 1. Vp.W. i. v. Dauerinfusion von 30 γ /min Arterenol. Während der Arterenoldauerinfusion i. v. Injektion von 20 mg Regitin. — 1 Fußdurchleuchtungskurve ultrarot (Fußvolumen), 2 Fußdurchleuchtungskurve rot (Fußvolumen und O_2 -Sättigung), 3 Pulsfrequenz, 4 Blutdruck, 5 Atmung, 6 Venendruck. — *Untere Kurve*: 1 Ohrdurchleuchtungskurve rot (Ohrvolumen), 2 Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen), 3 Pulsfrequenz, 4 Blutdruck, 5 Atmung.

beobachtet (untere Kurve). Die Zunahme der Blutfülle im Muskelgebiet des Fußes geht mit einer geringen Aufbesserung der Sauerstoffsättigung

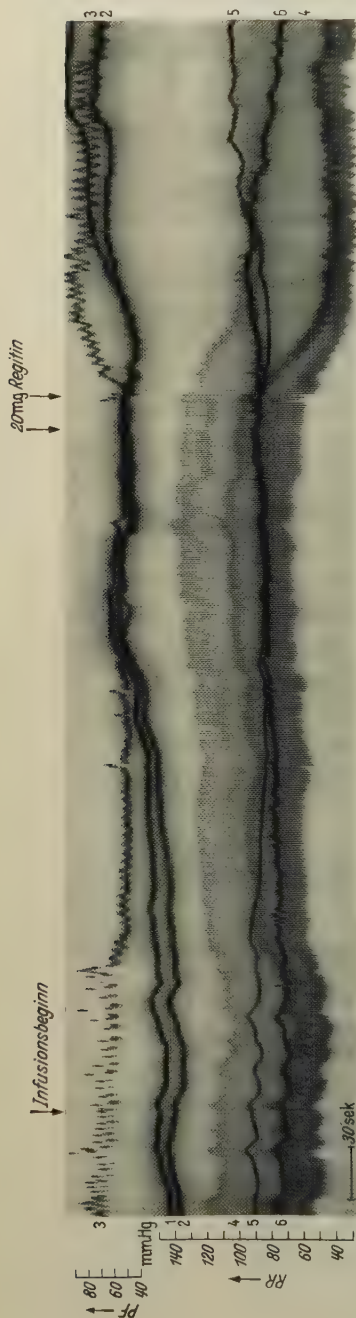


Abb. 2. Vp. B. i. v. Dauerinfusion von 30 γ /min Arterenol. Während der Arterenoldauerinfusion i. v. Injektion von 20 mg Regitin. — 1 Fußdurchleuchtungskurve rot (Fußvolumen und O_2 -Sättigung). 2 Fußdurchleuchtungskurve Ultra rot (Fußvolumen). 3 Pulsfrequenz. 4 Blutdruck. 5 Zehndurchleuchtungskurve vom gleichen Fuß rot (Zehnvolumen und O_2 -Sättigung). 6 Zehndurchleuchtungskurve vom gleichen Fuß ultrarot (Zehnvolumen und O_2 -Sättigung).

des Blutes einher. Am Ohr dagegen wird bei vermindertem Blutgehalt eine Abnahme der Sauerstoffsättigung festgestellt. Der Venendruck steigt mit beginnender systolischer und diastolischer Druckerhöhung schnell an und verläßt den Registrierbereich des Films (obere Kurve). Die Atmung ist während der Arterenolinfusion unverändert.

Während der Regitininjektion erfolgt ein erheblicher Druckabfall bis unter den Ruheausgangswert bei gleichzeitig einsetzender Tachykardie. Während des abrupten Druckabfalles wird die Atmung beschleunigt und vertieft. Bei Fortsetzung der Infusion wird eine sehr geringe kontinuierliche Druckerhöhung beobachtet. Am Ohr (untere Kurve) tritt eine deutliche Volumenzunahme mit Aufbesserung der Sauerstoffsättigung auf. Mit zunehmender Infusionsdauer nimmt das Ohrvolumen wieder ab. Am Fuß wird nach Regitin eine Abnahme der Blutfülle beobachtet, die gleichzeitig mit abfallendem Venendruck auftritt. Nach Absetzen der Arterenolinfusion sieht man eine nochmalige geringe Drucksenkung.

Registriert man an einer Extremität gleichzeitig das Fuß- und Zehnvolumen, so findet man, daß bei Volumenzunahme am Fuß eine Abnahme des Volumens und der Sauerstoffsättigung an der Zehe eintritt (Abb. 2). Da weitere 9 Versuche diese Befunde bestätigen, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß während der Arterenolinfusion folgende Kreislaufänderungen eintreten: systolischer

und diastolischer Druckanstieg, Pulsfrequenzabnahme, sehr geringe Zunahme oder keine Veränderung der Druckamplitude (siehe Abb. 6), Abnahme des Ohrvolumens mit Verminderung der Sauerstoffsättigung des Blutes und Abnahme der Ohrtemperatur (7 Versuche), Venendrucksteigerung (6 Versuche), Zunahme des Blutgehaltes am Fuß mit geringer Aufbesserung der Sauerstoffsättigung (4 Versuche); Abnahme von Blutgehalt und Sauerstoffsättigung an der Zehe (4 Versuche).

Diese Kreislaufumstellungen werden bei Fortsetzung der Dauerinfusion mit Ausnahme der Pulsfrequenz durch Regitin in gegensätzlichem Sinne beeinflusst.

2. Adrenalindauerinfusion 30 γ /min, während der Infusion intravenöse Injektion von 20 mg Regitin (Anzahl der Versuche: 11). Die während der

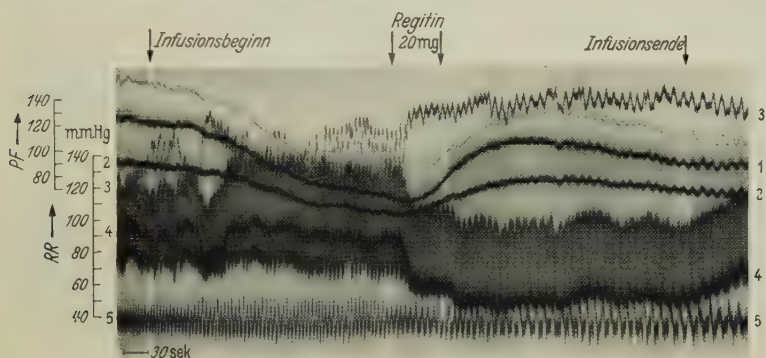


Abb. 3. Vp. H. i.v. Dauerinfusion von 30 γ /min Adrenalin. Während der Dauerinfusion i.v. Injektion von 20 mg Regitin. — 1 Ohrdurchleuchtungskurve ultrarot (Ohrvolumen). 2 Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und O_2 -Sättigung). 3 Pulsfrequenz. 4 Blutdruck. 5 Atmung.

Adrenalininfusion auftretenden Kreislaufveränderungen und deren Beeinflussung durch Regitin zeigen die Abb. 3 und 4. Während der Infusion sieht man folgende Kreislaufumstellungen: systolischer Druckanstieg bei geringem diastolischen Druckabfall, ausgeprägte Druckamplitudenzunahme, anhaltende Tachykardie, Abnahme des Ohrvolumens mit Verminderung der Sauerstoffsättigung (Abb. 3), Zunahme des Blutgehaltes am Fuß mit geringer Aufbesserung der Sauerstoffsättigung (Abb. 4 u. 5, andere Strahleneinstellung gegenüber Abb. 1). Am Zeh des gleichen Fußes anfänglich Zunahme des Volumens und der Sauerstoffsättigung, übergehend in Abnahme von Volumen und Sauerstoffsättigung (Abb. 4), oder bei kontinuierlicher Zunahme der Blutfülle des Fußes eine Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme am Zeh ohne initiale Zunahme (Abb. 5).

Nach Regitin werden bei Fortsetzung der Adrenalininfusion folgende Änderungen beobachtet: erheblicher Druckabfall unter den Ausgangswert, Zunahme von Volumen und Sauerstoffsättigung am Ohr; am Fuß

anfänglich eine deutliche Volumenabnahme, die in eine erhebliche Volumen- und Sauerstoffsättigungszunahme des Blutes übergeht. Am Zeh erfolgt unmittelbar nach der Regitingabe eine weitere Volumenabnahme.

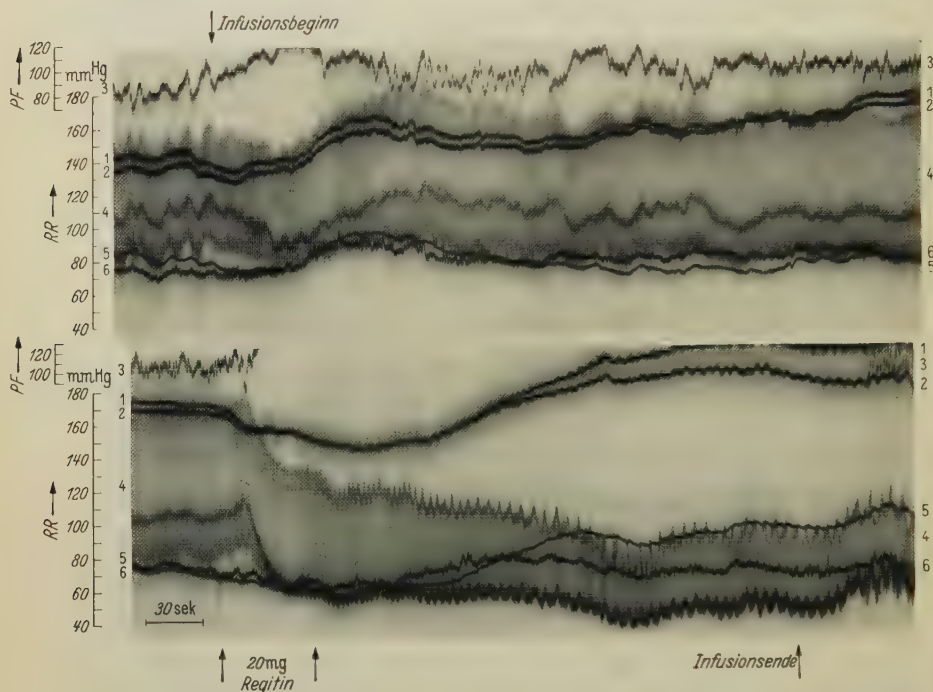


Abb. 4. Vp.H. i. v. Dauerinfusion von 30 γ /min Adrenalin. Während der Adrenalindauerinfusion i. v. Injektion von 20 mg Regitin. — 1 Fußdurchleuchtungskurve rot (Fußvolumen und O_2 -Sättigung). 2 Fußdurchleuchtungskurve ultra rot (Fußvolumen). 3 Pulsfrequenz. 4 Blutdruck. 5 Zehdurchleuchtungskurve ultrarot am gleichen Fuß (Zehvolumen). 6 Zehdurchleuchtungskurve rot am gleichen Fuß (Zehvolumen und O_2 -Sättigung).

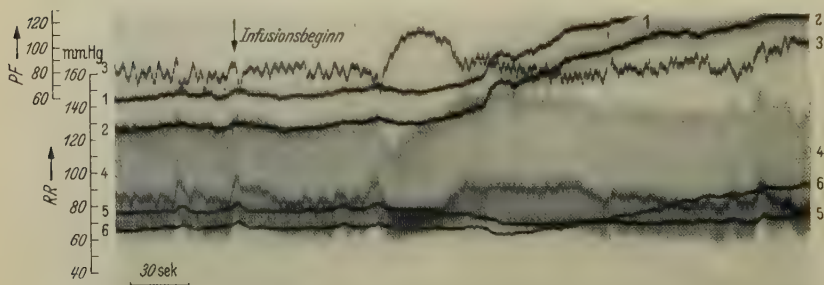


Abb. 5. Vp.W. i. v. Dauerinfusion von 30 γ /min Adrenalin. — 1 Fußdurchleuchtungskurve rot (Fußvolumen und O_2 -Sättigung). 2 Fußdurchleuchtungskurve ultra rot (Fußvolumen). 3 Pulsfrequenz. 4 Blutdruck. 5 Zehdurchleuchtungskurve ultra rot am gleichen Fuß (Zehvolumen). 6 Zehdurchleuchtungskurve rot am gleichen Fuß (Zehvolumen und O_2 -Sättigung).

Während der Fortsetzung der Adrenalininfusion wird eine erhebliche Volumenzunahme und Aufbesserung der Sauerstoffsättigung am Zeh beobachtet. Nach der Regitingabe findet sich eine Normalisierung der während der Adrenalininfusion beschleunigten und vertieften Atmung. Die Pulsfrequenz nimmt weiter zu. Die Auswertung der weiteren 9 Versuche bestätigt diese Veränderungen (Registrierung von Ohrvolumen, Sauerstoffsättigung und Temperatur: 6 Versuche; Fußvolumen und Sauerstoffsättigung: 6 Versuche). In 9 Versuchen wird festgestellt, daß der Venendruck die gleichen Veränderungen zeigt, wie sie bei Arterenolinfusion beobachtet werden.

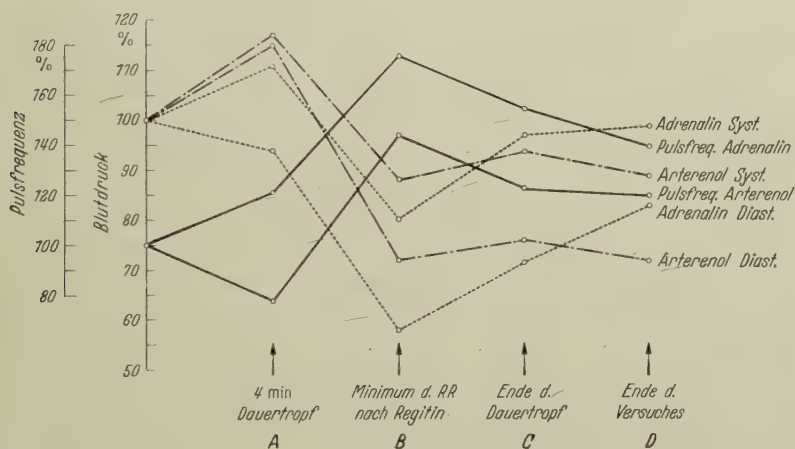


Abb. 6. Mittelwerte der prozentualen Druck- und Pulsfrequenzänderungen, Ruhewerte: 100%. Vergleichende Auswertung der Adrenalin- und Arterenolinfusionen bei der gleichen Versuchsperson (6 Versuchspersonen). — A Nach 4 min Infusionsdauer. B Bei optimaler Drucksenkung nach Regitingabe. C Unmittelbar vor Absetzen der Infusionen. D Unmittelbar vor Ende der Versuche.

Die Abb. 6 zeigt die Mittelwerte der prozentualen Druck- und Pulsfrequenzänderungen bei vergleichenden Untersuchungen von 6 Personen mit Adrenalin und Arterenol. Man sieht, daß 4 min nach Beginn der Arterenolinfusion eine nahezu gleichgroße prozentuale Zunahme des systolischen und diastolischen Drucks eintritt, während nach Adrenalin bei weniger ausgeprägten systolischem Druckanstieg eine geringe diastolische Drucksenkung resultiert. Die optimale Regitingwirkung führt bei kontinuierlicher Fortsetzung der Adrenalin- und Arterenolinfusion zu einer etwa gleichgroßen prozentualen Drucksenkung. Auffällig ist, daß im Vergleich zu Arterenol bei Fortsetzung der Adrenalininfusion ein stärkerer Wiederanstieg des Druckes resultiert, der auch nach Absetzen der Infusion weiter anhält. Nach Absetzen der Arterenolinfusion sinkt der Druck dagegen wieder etwas ab. Die Mittelwerte der Pulsfrequenz

ergeben richtungsmäßig gleiche Änderungen, wenn man von den während der Adrenalin- bzw. Arterenolinfusion eingetretenen unterschiedlichen Ausgangswerten ausgeht. Die Adrenalininfusion führt zu einer Pulsfrequenzzunahme, während bei der Arterenolinfusion eine Verlangsamung der Herzschlagfolge eintritt. Diese Befunde werden bei Auswertung aller Untersuchungen ohne Berücksichtigung der vergleichenden Betrachtung der pharmakologischen Wirkung an der gleichen Person bestätigt.

Besprechung der Ergebnisse.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß während Arterenol- und Adrenalininfusionen grundsätzlich gleichartige periphere Kreislaufumstellungen ausgelöst werden bei unterschiedlichem Blutdruck- und Pulsfrequenzverhalten. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da man die Druckerhöhung nach Arterenol mit einer Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes infolge ausgedehnter Vasokonstriktion peripherer Gefäßgebiete erklärt und für die Adrenalindrucksteigerung eine Minutenvolumenzunahme verantwortlich macht^{1, 2, 5, 7, 11, 13, 15, 23, 27, 30, 31, 35, 39}. Die Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme am Ohr und Zeh kann mit der Abnahme einer verminderten Hautdurchblutung erklärt werden. Diese Deutung wird gestützt durch die Untersuchungen von BARCROFT u. SWAN⁴, die bei intraarterieller und intravenöser Infusion von Arterenol und Adrenalin eine Abnahme des Blutflusses der Hand finden, den sie mit einer herabgesetzten Hautgefäßdurchblutung erklären. Die Volumenzunahme am Fuß bei geringer Aufbesserung der Sauerstoffsättigung während der Infusion der Wirkstoffe läßt an eine Mehrdurchblutung der Muskelgefäße denken. Besonders kurz nach Beginn der Infusion resultiert eine deutliche Volumenzunahme, die nach vorübergehender Wiederabnahme bis nahe dem Ausgangswert bei Fortsetzung derselben kontinuierlich anhält (Abb. 4). Auf der Abb. 5 ist die initiale Volumenzunahme des Fußes nur angedeutet. Mit der „venous occlusion-Methode“ haben BARCROFT u. SWAN⁴ sowie WHELAN³⁸ nach intravenöser Adrenalininfusion eine erhebliche initiale Zunahme des Muskelblutflusses (Vorderarm und Unterschenkel) und eine darauf folgende anhaltende Flußzunahme beobachtet. Bei der Arterenolinfusion wird von BARCROFT u. SWAN⁴ eine geringe Abnahme des Muskelblutflusses festgestellt. WHELAN³⁸ findet dagegen auch während der Arterenolinfusion eine Zunahme des Muskelblutflusses. Eine Erweiterung der Muskelgefäße nach Noradrenalin erwähnt McDOWALL⁸ in einer Diskussionsbemerkung. Klinisch wurde eine günstige therapeutische Wirkung geringer Arterenoldosen bei coronaren und peripheren Durchblutungsstörungen beobachtet³³.

Eine Erklärung der Volumenzunahme im Muskelgebiet sowohl bei Adrenalininfusion wie im besonderen bei Arterenolgabe ist nur in Form einer hypothetischen Diskussion möglich.

SCHAEFER³⁴ betont, daß die Gefäßweite nicht von 2 neuronalen Antagonisten geregelt wird, sondern durch das Gleichgewicht eines neuronalen Prozesses (Vasokonstriktion) mit einem peripheren Stoffwechselprozeß. Für die Erklärung der unterschiedlichen Arterenol- und Adrenalinwirkung auf die Gefäßweite nimmt SCHAEFER eine verschieden starke Beeinflussung der sympathischen Ganglien sowie einen differenten, peripher konstringierenden Effekt durch diese Wirkstoffe an. Mit dieser Vorstellung kann man die Adrenalinmehrdurchblutung des Muskels mit vermehrten vasodilatatorischen Effekten der Katabolite und Überwiegen der ganglionären Blockung bei weniger wirksamen konstringierenden Prozessen erklären. BARCROFT u. SWAN⁴ sowie WHELAN³⁸ führen die länger anhaltende Vasodilatation nach Adrenalingabe nicht auf eine direkte lokale Adrenalinwirkung zurück. Sie diskutieren die Möglichkeit der Freisetzung humoraler Substanzen, die während der Adrenalinpassage gebildet werden. Diese Vorstellung steht mit der Deutung SCHAEFERS in Übereinstimmung, wenn man die humoralen Stoffe als gefäßerweiternde Katabolite betrachtet. WHELAN³⁸ konnte zeigen, daß nach Ausschalten der nervösen Innervation während der Arterenolinfusion keine Flußzunahme auftritt, sondern eine Abnahme desselben resultiert. Auch bei intraarterieller Infusion beobachtete WHELAN eine Muskelflußabnahme.

Als Ursache der vermehrten Blutfüllung am Fuß nach Arterenolgabe ist auch an einen druckpassiven Effekt zu denken, da nach Arterenol der arterielle Mitteldruck erheblich ansteigt. Die Abb. 1 (obere Kurve) schränkt diese Deutungsmöglichkeit jedoch erheblich ein, da das Fußvolumen nicht gleichzeitig mit dem arteriellen Druck abnimmt.

Nach der Diskussion der Adrenalin- und Arterenolbefunde ist eine Erklärung der Regitinwirkung unter Berücksichtigung dieser Veränderungen notwendig. In den vorliegenden Untersuchungen ändern sich nach Regitingabe alle registrierten Kreislaufgrößen mit Ausnahme der Pulsfrequenz in gegensätzlichem Sinne. Die geringen Unterschiede der Druckänderungen zeigen, daß die Kreislaufumstellungen beider Wirkstoffe in gleichem Ausmaß vom Regitin beeinflusst werden, wenn ein gleiches Dosenverhältnis gewährleistet ist. Bemerkenswert ist, daß ausgeprägtere prozentuale Drucksenkungen auftreten, wenn man das Sympathicolyticum während einer Adrenalin- oder Arterenolinfusion spritzt, im Vergleich zu den Drucksenkungen, die nach Regitininjektionen allein beobachtet werden (Tab. 1).

Die spezifische sympathicolytische Regitinwirkung besteht in einer Verdrängung des Adrenalins und des Arterenols vom konstringierenden Wirkort infolge größerer eigener Affinität und Haftfähigkeit. In Durchströmungs- und Auswaschversuchen am Kaninchenohr hat FLECKENSTEIN¹² die große Haftfähigkeit und spezifische Affinität des Regitins für den Receptor (Gefäßmuskelzelle) des Adrenalins nachgewiesen. Der konstriktorische Adrenalineffekt wird durch Regitin aufgehoben, während die gefäßerweiternde Wirkung unbeeinflusst bleibt. Eine

Verschiebung des Gleichgewichtes der Gefäßweitenregelung in vasodilatatorischer Richtung resultiert und erklärt den stärkeren Druckabfall bei Adrenalin im Vergleich zu Arterenol.

Tabelle 1. *Mittelwerte der prozentualen Druck- und Frequenzänderungen nach Regitineinzelinjektionen sowie Regitingaben während der Adrenalin- und Arterenolinfusion.*

Ruheausgangswerte des Druckes und der Frequenz: 100%.

Ausgewertet wurden die Zeitabschnitte der optimalen Drucksenkungen nach Regitin.

Systl. RR	diast. RR	Pulsfrequenz	
87%	86%	127%	Regitineinzelinjektionen *
87%	68%	140%	Regitin während der Arterenolinfusion
75%	52%	176%	Regitin während der Adrenalininfusion

* Auswertung der Tab. 1 der Arbeit HEINZEL, F., K. MATTHES, K. MECHELKE u. E. NUSSER²⁴.

Mit Nachlassen der sympathicolytischen Beeinflussung der konstriktorischen Effekte steigt der Druck wieder an und die Durchblutung zeigt die gleichen richtungsmäßigen Veränderungen wie vor der Regitininjektion.

Für die Differentialdiagnostik der bei Phäochromozytomkranken auftretenden Hypertonie weisen die vorliegenden Untersuchungen darauf hin, daß unabhängig vom sezernierten Wirkstoff ein positiver Regitintest zu erwarten ist.

Zusammenfassung.

Bei 28 gesunden Menschen wird die Beeinflussung der bei Adrenalin- und Arterenoldauerinfusion auftretenden Kreislaufveränderungen durch Regitin untersucht.

Während der Arterenoldauerinfusion wird folgende Kreislaufumstellung festgestellt: unveränderte oder sehr geringe Druckamplitudenzunahme, Ohrvolumenabnahme mit Verminderung der Sauerstoffsättigung des Blutes und Abnahme der Ohrtemperatur, Venendrucksteigerung, Zunahme des Blutgehaltes am Fuß mit geringer Aufbesserung der Sauerstoffsättigung. Registriert man am gleichen Fuß gleichzeitig die Durchblutung einer Zehe, so findet man, daß bei Zunahme des Blutgehaltes am Fuß eine Abnahme des Zehvolumens eintritt.

Während der Adrenalininfusion wird abweichend von diesen Befunden eine weniger ausgeprägte systolische Drucksteigerung bei geringer diastolischer Drucksenkung festgestellt. Die Druckamplituden werden erheblich größer. Eine anhaltende Tachykardie wird beobachtet. Während der Arterenol- und Adrenalininfusion treten prinzipiell gleichartige Volumeneffekte auf.

Die während der Infusion eintretenden Kreislaufveränderungen werden mit Ausnahme der Pulsfrequenz durch die Regitingabe in gegensätzlichem Sinne beeinflusst. Bei Arterienol- und Adrenalininfusionen resultieren nach Regitin etwa gleiche prozentuale Drucksenkungen. Diese sind ausgeprägter im Vergleich zu den Drucksenkungen, die nach Regitineinzelinjektionen beobachtet werden.

Literatur.

- ¹ ABDERHALDEN, R.: Lehrbuch für Physiologie. Springer 1952. — ² BAYER, O., KJ. BLUMBERGER u. S. EFFERT: *Cardiologia* (Basel) **16**, Fasc. 3, 145 (1950). — ³ BAYER, J. M., u. H. ODENTHAL: *Langenbecks Arch. u. Dtsch. Z. Chir.* **274**, 406 (1953). — ⁴ BARCROFT, H., and H. J. C. SWAN: Sympathetic control of human blood vessels. London: E. Arnold 1953. — ⁵ CHURCHILL-DAVIDSON, H. C.: *Brit. Med. J.* **1951**. — ⁶ BERNSMEIER, A., H. ESSER u. B. LORENZ: *Med. Klin.* **1951** 1236. — BERNSMEIER, A., H. ESSER u. J. BECKER: *Z. exper. Med.* **121**, 430 (1953). — BERNSMEIER, A., u. J. BECKER: *Dtsch. Arch. klin. Med.* **200**, 451, 464, 629, 639 (1953). — ⁷ BERNSMEIER, A., H. WILD u. H. GIERTZ: *Z. exper. Med.* **116**, 300 (1950). — ⁸ McDOWALL, R. J. S.: *Visceral Circulation*. London: J. A. Churchill Ltd. 1952. — ⁹ EMLET, J. R., K. S. GRIMSON, D. M. BELL and E. S. ORGAIN: *J. Amer. Med. Assoc.* **146**, 15, 1383 (1951). — ¹⁰ ENTWISLE, G., C. A. STONE and E. R. LOEW: *Amer. J. Med.* **11**, 461 (1951). — ¹¹ v. EULER, U. S.: *Dtsch. med. Wschr.* **1950**, 50, 1675. — ¹² FLECKENSTEIN, A.: *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 553 (1952). — ¹³ FOWLER, N. O., R. N. WESTCOTT, R. C. SCOTT and J. MCGUIRE: *J. Clin. Invest.* **30**, 517 (1951). — ¹⁴ GATZEK, H., K. MATTHES u. K. MECHELKE: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **207**, 720 (1949). — ¹⁵ GATZEK, H., K. MATTHES u. K. MECHELKE: *Z. exper. Med.* **115**, 586 (1950). — ¹⁶ GIFFORD, R. W., G. M. ROTH and W. F. EVALE: *J. Amer. Med. Assoc.* **149**, 1628 (1952). — ¹⁷ GERMER, W. D., u. J. KLÖSS: *Med. Klin.* **1953**, 200. — ¹⁸ GRAHAM, J. B.: *Internat. Abstr. Surg.* **92**, 105 (1951). — ¹⁹ GRIMSON, K. S., C. K. LYONS, J. T. WORTHAM and E. C. HAMBLE: *J. Clin. Invest.* **29**, 819 (1950). — ²⁰ GRIMSON, K. S.: *Surgery* (St. Louis) **28**, 436 (1950). — ²¹ GRIMSON, K. S., F. H. LONGINO, C. K. KERNODLE and H. B. O'REAR: *J. Amer. Med. Assoc.* **140**, 1273 (1949). — ²² GRIMSON, K. S., J. R. EMLET and E. C. HAMBLE: *Ann. Surg.* **134**, 451 (1951). — ²³ GOLDENBERG, M., V. APGAR, R. DETERLING and K. L. PINES: *J. Amer. Med. Assoc.* **140**, 776 (1949). — ²⁴ HEINZEL, F., K. MATTHES, K. MECHELKE u. E. NUSSE: *Cardiologia* (Basel) **21**, 743 (1952). — ²⁵ ISERI, L. T., H. W. HENDERSON and J. W. DERR: *Amer. Heart J.* **42**, 129 (1951). — ²⁶ KLEINSORGE, H., u. K. RÖSNER: *Ärztl. Wschr.* **1953**, 639. — ²⁷ KAPPERT, A., G. C. SUTTON, A. REALE u. K. H. SKOGLUND: *Cardiologia* (Basel) **16**, Fasc. 3, 131 (1950). — ²⁸ LICHTENBERG, E., E. STRICKER u. C. BUETTI: *Helvet. med. Acta* **19**, Fasc. 4/5378 (1952). — ²⁹ MATTHES, K.: *Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden*. Thieme 1951. — ³⁰ MECHELKE, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **212**, 149 (1950). — ³¹ MÖLLER, K. O.: *Pharmakologie*. Basel: Bruno Schwabe 1953. — ³² PEIPER, H., u. H. SPITZBARTH: *Dtsch. med. Wschr.* **1953**, 253. — ³³ RÖSSING, P., u. M. GRUBER: *Medizinische* (Stuttgart) **49**, 1563 (1952). — ³⁴ SCHAEFER, H.: *Acta neurovegetativa* (Wien) **4**, 201 (1952). — ³⁵ SCHROEDER, W., u. F. ANSCHÜTZ: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **212**, 230 (1951). — ³⁶ SCHWAB, R., u. K. DENNINGER: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 1472. — ³⁷ STAEHELIN, A.: *Praxis* (Bern) **1954**, 21. — ³⁸ WHELAN, R. F.: *Peripheral Circulation in man*. S. 75. London: J. A. Churchill 1954. — ³⁹ WITHAM, A. C., and J. W. FLEMING: *J. Clin. Invest.* **30**, 707 (1951).

Dr. H. A. DITTMAR, Heidelberg, Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. K. MATTHES).

Vergleichende Untersuchungen der Kreislaufwirkung von Sympatol, P-Oxyphenylaminoäthanol-campfersulfonat (POPC) und Veritol beim gesunden Menschen.

Von

K. MECHELKE und E. NUSSER*.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1954.)

In vorliegenden Untersuchungen wird die Kreislaufwirkung von Sympatol¹ und POPC² vergleichend mit Hilfe von Einzelinjektionen und Dauerinfusionen untersucht. Ergänzend wird über die Veritoldauerinfusionswirkung³ berichtet.

Methodik.

Der arterielle Druck wurde mit dem LILLY-Kondensator-Manometer (Firma Technitrol Engineering Company Philadelphia) und intraarteriellem Katheter registriert. Die Venendruckschreibung erfolgte mit dem Strain Gauge-Manometer. Volumen und Sauerstoffsättigung des Blutes am Ohr und Finger wurden mit ultrarot- und rotempfindlichen Photozellen nach MATTHES registriert, Pulsfrequenzschreibung nach MATTHES. Atmung: Pneumotachogramm nach HOCHREIN. Infusionen wurden mit dem Gerät der Firma B. Braun, Melsungen, ausgeführt.

Ergebnisse.

1. *Vergleichende Untersuchungen der Kreislaufänderungen nach intravenöser Injektion von 30 mg Sympatol und 30 mg POPC (Injektionsdauer 25 sec).* Die obere Kurve der Abb. 1 zeigt die Wirkung einer intravenösen Injektion von 30 mg Sympatol. Man sieht einen zweigipfligen Anstieg des Blutdrucks. Während des ersten kurzfristigen geringen Druckanstiegs, der bereits während der letzten 5 sec der Injektion beginnt, tritt eine geringe Bradykardie auf. Mit Beginn der anschließenden Blutdrucksenkung wird eine Zunahme der Herzschlagfolge beobachtet. Während der folgenden maximalen Druckerhöhung sieht man eine deutliche Pulsfrequenzabnahme. In den folgenden Minuten fällt der Blutdruck langsam

* Unter Mitarbeit von cand. med. O. HIRSCH.

¹ Chem. Bezeichnung: 1-(4'-oxyphenyl)-1-oxy-2-methylaminoäthan.

² Der Fa. BYK Gulden danken wir für Überlassung des POPC-Präparates.

³ Chem. Bezeichnung: 1-(4'-oxyphenyl)-2-methyl-aminopropan.

auf seinen Ausgangswert ab und hat diesen nach etwa 5 min wieder erreicht. Man sieht, daß gleichzeitig mit dem Beginn des Venendruckanstieges am Ohr eine Volumenabnahme mit Verminderung der Sauerstoffsättigung eintritt.

Im Gegensatz zu Sympatol steigt der Blutdruck nach Gabe von 30 mg POPC sofort auf seinen höchsten Wert an (untere Kurve der Abb. 1). Entsprechend dem eingipfligen Druckverlauf wird auch bei der Pulsfrequenz nur ein einphasisches Verhalten beobachtet. Mit dem Druck-

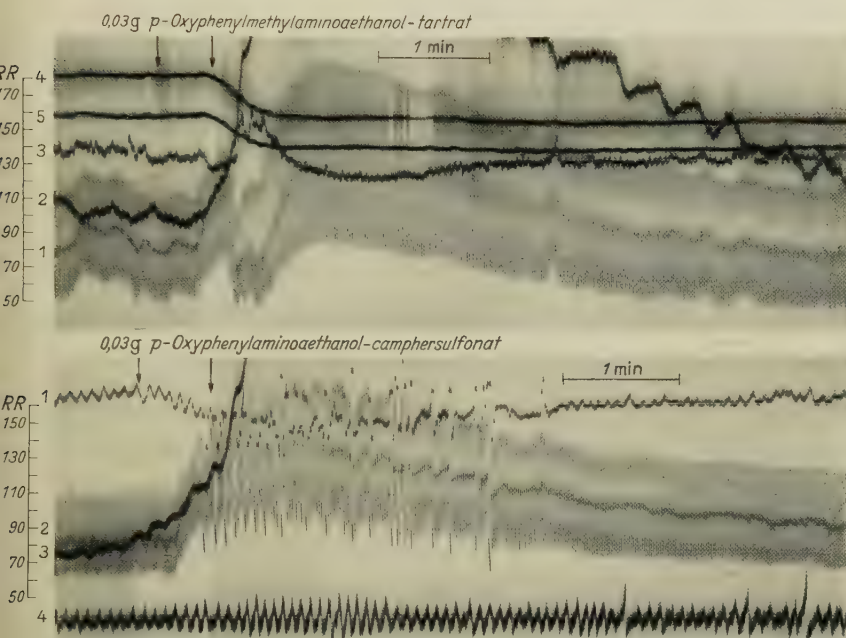


Abb. 1. Obere Kurve: intravenöse Injektion von 30 mg Sympatol. — 1. Blutdruck; 2. Venendruck; 3. Pulsfrequenz; 4. Ohrdurchleuchtungskurven ultrarot (Ohrvolumen); 5. Ohrdurchleuchtungskurve rot (Volumen und Sauerstoffsättigung). — Untere Kurve: intravenöse Injektion von 30 mg POPC. — 1. Pulsfrequenz; 2. Blutdruck; 3. Venendruck; 4. Atmung.

anstieg sieht man eine beträchtliche Verlangsamung der Herzschlagfolge. Regelmäßig treten während der Bradykardie Unregelmäßigkeiten der Herzschlagfolge auf. In Übereinstimmung mit den Sympatolergebnissen wird bei POPC eine Venendruckerhöhung und Ohrvolumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme sowie eine geringe Beschleunigung und Vertiefung der Atmung festgestellt. Abb. 2 zeigt, daß nach POPC im Vergleich zu Sympatol eine stärkere und länger anhaltende Druckerhöhung bei ausgeprägterer Pulsfrequenzabnahme eintritt. Die Abhängigkeit der Blutdruck- und Frequenzänderungen von der Dosierung des POPC wurde an der gleichen Versuchsperson nachgewiesen (Tab. 1).

Tabelle 1.

Druck- und Pulsfrequenzänderungen bei unterschiedlicher Dosierung von POPC.

Dosierung mg	maximale Druckerhöhung		maximale Puls- frequenzabnahme min	Dauer der Druck- erhöhung nach Injektionsende
	systolisch	diastolisch		
2,5	+ 8 mm Hg	+10 mm Hg	—9	55 sec
5	+ 7 mm Hg	+10 mm Hg	—6	65 sec
10	+20 mm Hg	+10 mm Hg	—9	200 sec
20	+38 mm Hg	+11 mm Hg	—18	300 sec

Zusammenfassend werden folgende Kreislaufänderungen beobachtet:
 Sympatol: doppelgipfliger Druckanstieg mit mehrphasischen Puls-
 frequenzänderungen (7 Versuche); Venendruckanstieg (6 Versuche);

Beschleunigung und Vertiefung der Atmung (3 Versuche).

POPC: eingipfliger Druckanstieg mit einphasischen Pulsfrequenzänderungen (8 Versuche); Venendruckanstieg (7 Versuche); Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme am Ohr (5 Versuche); Beschleunigung und Vertiefung der Atmung (3 Versuche).

2. Vergleichende Untersuchungen der Kreislaufänderungen während der intravenösen Dauerinfusion von Sympatol und POPC. Abb. 3 zeigt, daß sich während der Infusion von 11,25 mg Sympatol ein gleichmäßig erhöhter systolischer und erniedrigter diastolischer Blutdruck einstellt. In drei Versuchen wurden diese konstanten Druckänderungen bis zu einer Infusionsdauer von

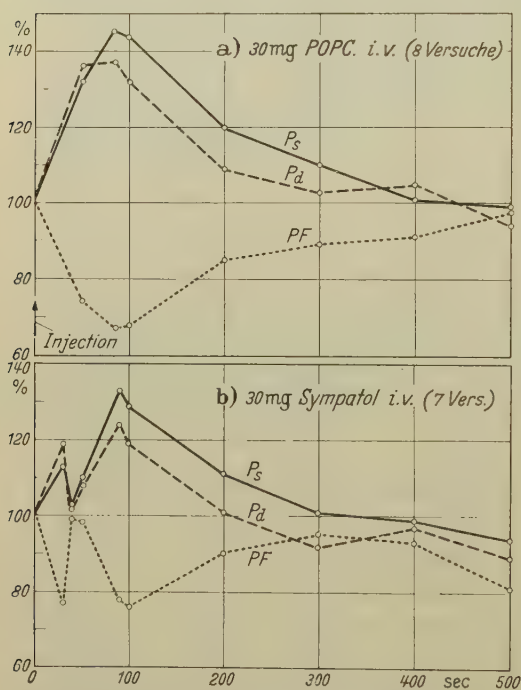


Abb. 2. Mittelwerte der prozentualen Blutdruck- und Pulsfrequenzänderungen nach intravenöser Injektion von 30 mg Sympatol (7 Versuche) und 30 mg POPC (8 Versuche). Blutdruck- und Pulsfrequenzwerte vor pharmakologischer Belastung: 100%. Abszisse: Sekunden; Ordinate: Prozentuale Änderungen.

20 min beobachtet. Während der ersten 150 sec der Infusion ist die Doppelgipfligkeit des Druckanstieges deutlich ausgeprägt. Nach Infusionsende erreicht der systolische Blutdruck in 200 sec den Ruhedruck.

Der diastolische Blutdruck sinkt von dem bereits erniedrigten Wert weiter etwas ab. Die Pulsfrequenz zeigt ein spiegelbildliches Verhalten zum Blutdruck.

In gleicher Weise wie bei den Einzelinjektionen sieht man eine Abnahme des Ohrvolumens mit geringer Verminderung der Sauerstoffsättigung des Blutes (2 Versuche). Der Venendruck bleibt während der

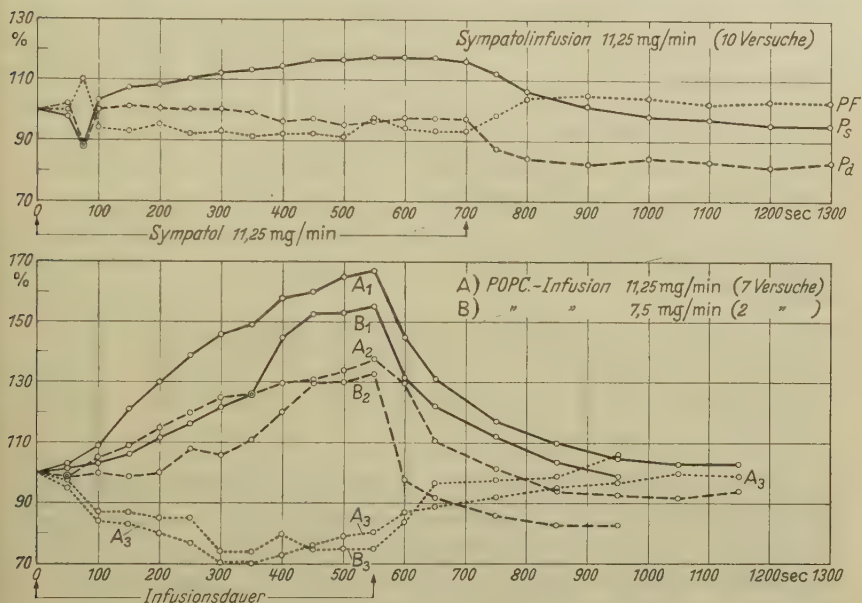


Abb. 3. Mittelwerte der prozentualen Blutdruck- und Pulsfrequenzänderungen. Abszisse: Sekunden; Ordinate: Prozentuale Abweichungen. — Obere Zeichnung: Infusion 11,25 mg/min Sympatol (10 Versuche). Gleichmäßige systolische Druckerhöhung und diastolische Druckerniedrigung, zweigipfliger Druckanstieg während der ersten 100 sec der Infusion. — Untere Zeichnung: a) Infusion 11,25 mg/min POPC (7 Versuche). Kontinuierlicher systolischer und diastolischer Druckanstieg. Mit längerer Infusionsdauer zunehmende Druckamplitudenvergrößerung. A_1 = systolischer Druck, A_2 = diastolischer Druck, A_3 = Pulsfrequenz. b) Infusion 7,5 mg/min POPC (2 Versuche). Während gleicher Infusionsdauer treten bei kontinuierlichem Druckanstieg geringere Druckerhöhungen auf.

B_1 = systolischer Druck, B_2 = diastolischer Druck, B_3 = Pulsfrequenz.

Infusion auf einem erhöhten Niveau (3 Versuche). Am Finger wird ein wechselndes Volumenverhalten festgestellt (2 Versuche: Volumen- und Sauerstoffsättigungszunahme, 6 Versuche: geringe Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme). Während der Infusion beobachtet man eine geringe Beschleunigung und Vertiefung der Atmung.

Während der Infusion von 11,25 mg POPC tritt dagegen ein kontinuierlicher Druckanstieg auf (Abb. 3). Eine initiale Drucksenkung wird vermisst. Nach anfänglicher Abnahme wird eine kontinuierliche Zunahme der Herzschlagfolge bei weiterer Druckerhöhung beobachtet. Die Pulsfrequenz erreicht jedoch nicht ihren Ruhewert. Gleichzeitig geben die

Versuchspersonen unangenehme subjektive Empfindungen an und es treten Unregelmäßigkeiten der Herzschlagfolge auf. Nach Absetzen der Infusion fällt der Druck im Vergleich zu Sympatol langsamer auf seinen Ruhewert ab. Bei einer Erniedrigung der Dosis auf 7,5 mg/min (2 Versuche) treten während der gleichen Infusionsdauer bei kontinuierlichem Druckanstieg geringere Druckerhöhungen auf (Abb. 3).

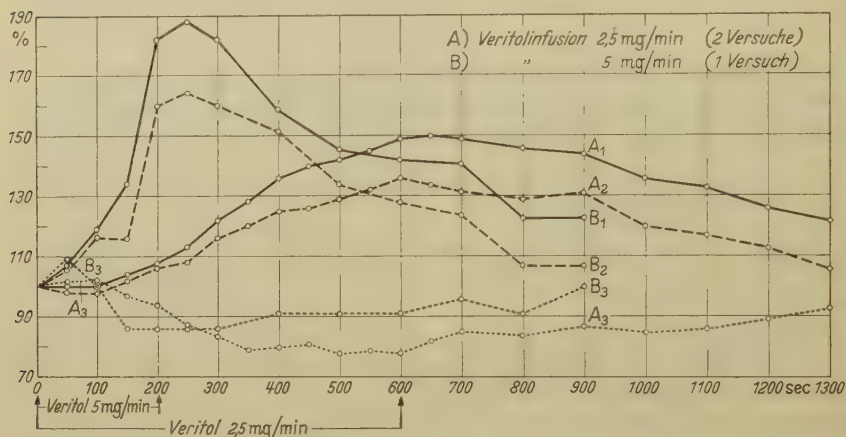


Abb. 4. Mittelwerte der prozentualen Blutdruck- und Pulsfrequenzänderungen. a) Veritolinfusion 2,5 mg/min (8 Versuche). Kontinuierlicher systolischer und diastolischer Druckanstieg. Optimale Druckerhöhungen 50 sec nach Infusionsende. Mit längerer Infusionsdauer zunehmende Druckamplitudenvergrößerung. A₁ = systolischer Blutdruck, A₂ = diastolischer Blutdruck, A₃ = Pulsfrequenz. b) Veritolinfusion 5 mg/min (1 Versuch). Die Untersuchung muß infolge der schnell eintretenden starken Drucksteigerung nach 200 sec abgebrochen werden. B₁ = systolischer Druck, B₂ = diastolischer Druck, B₃ = Pulsfrequenz.

Während der Infusion ist der Venendruck erhöht (5 Versuche); das Volumen und die Sauerstoffsättigung am Ohr (5 Versuche) und am Finger (3 Versuche) vermindert, die Atmung etwas beschleunigt und vertieft (3 Versuche).

3. Untersuchung der Kreislaufänderungen während der intravenösen Infusion von 2,5 mg/min Veritil (8 Versuche). Abb. 4 zeigt, daß ohne eine initiale Drucksenkung ein kontinuierlicher Druckanstieg eintritt bei gleichzeitiger Abnahme der Herzschlagfolge. Erst nach Absetzen der Infusion erreicht der Blutdruck seine höchsten Werte. Bei Registrierende haben Blutdruck und Pulsfrequenz sich noch nicht normalisiert.

Die gleichen richtungsmäßigen Druck- und Frequenzänderungen treten bei höherer Dosierung (5 mg/min 1 Versuch) schneller und ausgeprägter auf (Abb. 4). Während der Infusion wird eine Abnahme von Ohrvolumen und Sauerstoffsättigung sowie eine Beschleunigung und Vertiefung der Atmung beobachtet.

Besprechung.

Die direkte Schreibung des arteriellen Blutdrucks bestätigt die von MATTHES für den systolischen Druck mit indirekter Methodik erhobenen Befunde nach Sympatoleinzelinjektion, so daß für diese Ergebnisse auf seine Erklärung verwiesen werden kann. Die Unterschiede der Kreislaufänderungen bei Einzelinjektionen von Sympatol und POPC erinnern sehr an die Befunde, welche bei vergleichender Untersuchung von Adrenalin und Arterenol beobachtet werden (GATZEK, MATTHES u. MECHELKE). In gleicher Weise wie bei Arterenol tritt nach POPC eine starke Bradykardie ohne initiale Tachykardie auf und die erhebliche Drucksteigerung erfährt keine gegenregulatorische Hemmung. Die Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme kann mit einer verminderten Hautdurchblutung erklärt werden. Die weitgehende Übereinstimmung des Wirkungsbildes von Arterenol und POPC läßt vermuten, daß die Druckerhöhung nach POPC durch eine Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes hervorgerufen wird.

Ein wesentlicher Unterschied der Kreislaufwirkung von Arterenol und POPC wird erst bei der Dauerinfusion der Pharmaka beobachtet. Während der Infusion von POPC tritt keine gleichmäßige, anhaltende Blutdruckerhöhung ein. Ein kumulativer Effekt führt zu einer kontinuierlichen Drucksteigerung, so daß mit Auftreten unangenehmer subjektiver Empfindungen die Infusion abgebrochen werden muß. Bei der Veritolinfusion werden infolge der sehr ausgeprägten kumulativen Wirkung die maximalen Druckerhöhungen erst nach Absetzen der Infusion beobachtet. Während der Sympatolinfusion dagegen stellt sich der Blutdruck auf einen gleichmäßig erhöhten systolischen und gering erniedrigten diastolischen Wert ein.

Diese Befunde können mit einer unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeit der Pharmaka gedeutet werden. HEIM konnte nachweisen, daß Adrenalin und Sympatol durch die Aminooxydase rasch abgebaut werden. Im Gegensatz hierzu wird Veritol von der Aminooxydase nicht angegriffen. Die konstanten Druckänderungen während der Adrenalin-, Arterenol- und Sympatolinfusionen werden durch die schnelle Zerstörung der Pharmaka ermöglicht.

Zusammenfassung.

Im Gegensatz zu dem zweigipfligen Blutdruckanstieg und den mehrphasischen Pulsfrequenzänderungen nach intravenöser Injektion von 30 mg Sympatol wird nach der gleichen Dosis POPC eine eingipflige, stärkere Druckerhöhung sowie eine ausgeprägtere Bradykardie festgestellt. Während der optimalen POPC-Druckerhöhung treten Unregelmäßigkeiten der Herzschlagfolge auf. Nach POPC wird ein Venendruck-

anstieg, eine Volumen- und Sauerstoffsättigungsabnahme am Ohr sowie eine Beschleunigung und Vertiefung der Atmung beobachtet.

Während der Sympatolinfusion tritt eine konstante Erhöhung des systolischen und Erniedrigung des diastolischen Drucks auf. Die POPC-Infusion dagegen bewirkt einen kontinuierlich zunehmenden systolischen und diastolischen Druckanstieg. Auch die Veritolinfusion muß unterbrochen werden, da mit längerer Infusionsdauer der Blutdruck bei gleichzeitiger Druckamplitudenvergrößerung zunehmend ansteigt.

Das unterschiedliche Druckverhalten bei Infusion der Pharmaka wird mit einer verschiedenen Abbaugeschwindigkeit der Stoffe erklärt.

Literatur.

GATZEK, H., K. MATTHES u. K. MECHELKE: Z. exper. Med. **115**, 586 (1950). —
HEIM, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **204**, 520 (1947); **205**, 470 (1948). —
MATTHES, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart: Thieme-Verlag 1951.

Privatdozent Dr. K. MECHELKE, Heidelberg, Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg im Brsg.
(Direktor: Prof. Dr. med. LUDWIG HEILMEYER).

Die „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) unter verschiedenen Absonderungsarten der gesunden Nieren und ihre Beziehungen zur renalen Wasserbearbeitung.

Von

JOACHIM FREY, JOACHIM SCHIRMEISTER und HANS HENNING.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Januar 1954.)

1952 wurde mitgeteilt¹, daß die „Clearance der Harnfixasumme“ (J. FREY), die mit dem Symbol C_{Σ} ² kenntlich gemacht werden soll, als Maß der Gesamtleistung der Nieren dienen kann, und zwar nicht nur hinsichtlich der Ausscheidung der gelösten Stoffe, sondern auch des Lösungsmittels (J. FREY, 1952). Inzwischen wurden eine große Reihe von Untersuchungen am gesunden Menschen angestellt, um eine Ausgangsbasis für pathologische Veränderungen von C_{Σ} zu gewinnen.

Die aus der ADDIS-WATANABESchen Harnstoffausscheidungsquote (1916) entwickelte „Clearance“ für Harnstoff durch VAN SLYKE und Mitarb. (1928) hat sich als brauchbares Maß der Nierenleistung auch für alle übrigen nierengängigen Substanzen erwiesen (H. W. SMITH); die Clearance-Untersuchungen werden heute für eine Reihe von Eigen- und Fremdstoffen mit Erfolg angewandt und gewähren allgemein einen besseren Einblick in verschiedenartige Nierenleistungen als das in Deutschland bislang allein geübte Verfahren des Wasser- und Konzentrationsversuchs, mit dem — neben sehr vielen extrarenalen Bedingungen — nur die Fähigkeit der Nieren zu Wasser-Ausscheidung oder -einsparung erfaßt wird.

Die vorliegenden Untersuchungen beziehen sich auf die „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) unter verschiedenen Absonderungsarten der Nieren: Harnkonzentrierung, Wasserdurese (E. FREY, 1906) und Filtrationsdurese (J. FREY, 1952), wobei zum Vergleich die NaCl-Clearance (C_{NaCl}) herangezogen wurde.

Als Versuchspersonen dienten 181 erwachsene Nierengesunde jeglichen Alters; es wurden über 300 Clearance-Perioden von 2 Std Dauer ausgeführt. Die Harnkonzentrierung wurde durch Dursten (Karenz der Flüssigkeitsaufnahme 12—16 Std vor dem Versuch), eine Wasserdurese durch Wassertrinken verschiedener Quantitäten, eine Filtrationsdurese durch Coffein (2 Tassen starken Neskafee) und Salyrgan (1 ml = 0,1 mg) i. v. erzielt. Handelte es sich um Untersuchungen ohne

¹ Die ersten Ergebnisse, die mittels C_{Σ} an gesunden und kranken Nieren gewonnen wurden, waren in einem Vortrag auf dem III. Raduno della Sezione centro-meridionale di Urologia, Florenz, vom 9.—10. Mai 1952 enthalten.

² Σ = Sigma, übliches Symbol für die Summe.

Präzision einer bestimmten Funktionsweise der Nieren, so wurde auf jede Beeinflussung von Nahrungsmenge und -qualität und von Flüssigkeiten verzichtet. — Den Berechnungen diene die übliche Clearanceformel von VAN SLYKE (1928), für Volumina des Harns unter 2 ml/min wurde jedoch die von VAN SLYKE benutzte Berechnung der Quadratwurzel aus dem Harnvolumen nicht angewandt, weil sie als willkürliche rechnerische Manipulation weder einem normalen Absonderungsvorgang der Nieren entspricht, noch ihn zur Darstellung bringt, sondern nur als Erschwerung der Einsichtnahme gelten darf. Auf Blut- bzw. Serumbestimmungen wurde verzichtet, da beim Gesunden keine Veränderungen der Konzentration der Osmolarität im Plasma (δ), noch des Chlors bzw. des Chlornatriums vorliegen; sie wurden mit $-0,56^\circ$ und 600 mg% der Berechnung zugrunde gelegt.:

$$C_{\Sigma} = \frac{\Delta \text{Harn} \times \text{Harnminutenvolumen}}{\delta \text{ Plasma}}$$

$$\text{z. B. } \frac{1,68 \times 0,75}{0,56} = 2,25 \text{ ml/min/1,73 m}^2.$$

Alle Werte sind auf eine Körperoberfläche von 1,73 m², wie es international üblich ist, reduziert. Die Blasenentleerungen erfolgten im Stehen ohne Katheterismus. Die Bestimmung des Chlors wurde nach SASS und BERTRAM vorgenommen (Umrechnung in NaCl).

I.

Nimmt man den Durchschnittswert von 38 gesunden Versuchspersonen im *Durstversuch* unter den Bedingungen der renalen Wassereinsparung und trägt C_{Σ} (ml/min/1,73 m²) als Ordinate gegen das Harnzeitvolumen (ml/min) auf, so erhält man mit zunehmender Harnmenge einen ähnlichen Anstieg der Harnfixasumme, wie es auch bei einzelnen Harnbestandteilen, z. B.

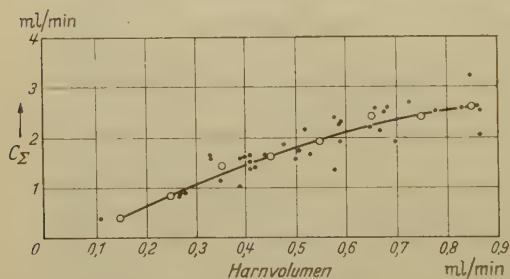


Abb. 1. Abhängigkeit von C_{Σ} (Clearance der Harnfixasumme) vom Harnvolumen unter den Bedingungen der Harnkonzentration: Anstieg von C_{Σ} bis 2,5 ml/min bei einem Harnminutenvolumen von 0,8 ml.

Harnstoff, der Fall ist (Abb. 1). Bei einem Harnzeitvolumen von 0,8 ml/min (= 1150 ml/d) ist mit 2,5 ml/min eine Grenze von C_{Σ} erreicht, die mit zunehmender Harnmenge (allerdings nur unter den Bedingungen der reinen Wasserdurese) nicht mehr überschritten wird; man kann also auch bei der Harnfixasumme eine „augmentation limit“ des Clearancewerts feststellen, wie es VAN SLYKE (1921) für Harnstoff bei 1,7—2,5 ml Harn pro Minute fand. Ist die Wasserzufuhr pro Tag also genügend, so wird dementsprechend bei einer Harnmenge von 1200 ml/d (= 0,84 ml/min) auch die Harnfixasumme maximal ausgeschieden. Bei jeder Harnmenge darunter verkleinert sich die Ausscheidung der Harnfixasumme aus funktionellen Gründen, falls die

Stoffaufnahme nicht ebenfalls zurückgeht. Stauen sich harnpflichtige Substanzen im Organismus an, so gehen die Nieren auch bei Beschränkung der Flüssigkeitsaufnahme zur Filtrationsdiurese über. Bei einer Harnmenge deutlich unter 1 Liter pro Tag sind die Nieren ohne gleichlaufende Verminderung der oralen Substanzaufnahme jedoch funktionell insuffizient:

Tabelle 1.

Tagesmenge Harn ml	C _Σ ml/min	Tagesmenge Harn ml	C _Σ ml/min
1200	2,5	700	1,7
1100	2,5	600	1,5
1000	2,4	500	1,2
900	2,2	400	0,9
800	1,9	300	0,6

Zur Ausscheidung einer bestimmten Harnfixasumme gehört also auch eine bestimmte und ausreichende Flüssigkeitsmenge und es ist deshalb nicht für jeden Fall einer akuten Glomerulonephritis völliges Dursten die beste Therapie, wenn auch bei gleichzeitigem Hungern die Harnfixasumme natürlich klein ist.

II.

Zur Demonstration der C_Σ bei *Wasserdiuresen* seien deren Durchschnittswerte in Abb. 2 wiedergegeben; die Versuchsperson (Sch.) trank

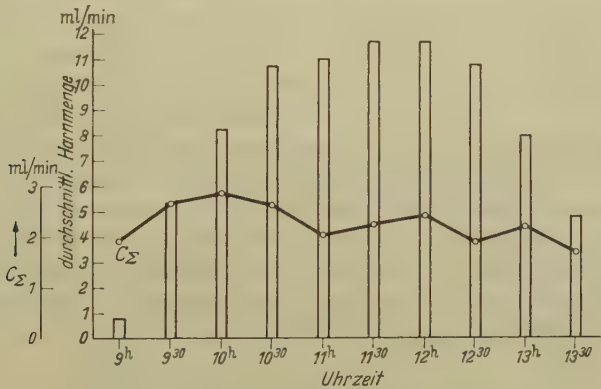


Abb. 2. C_Σ während des Ablaufs einer Wasserdiurese.

in 6 Trinkversuchen jeweils innerhalb von 70—90 min 3 Liter dünnen Tee, wobei Spitzenwerte der Harnausscheidung bis fast zu 12 ml/min erreicht wurden, was einer diencephal-hypophysären Polyurie (Diabetes insipidus) (J. FREY, 1950) mit 17 l/d entsprechen würde. Bei den vorliegenden Wasserdiuresen unterschreitet der Gefrierpunkt des Harns mit maximal —0,12° denjenigen des Blutes erheblich. Man erkennt, daß C_Σ den Wert von 2,5 ml/min mit steigender Harnmenge nicht überschreitet,

was bedeutet, daß die einmal erreichte augmentation limit der Harnfixasumme unter den Bedingungen der Wasserdiurese nicht verändert wird, falls das ausgeschiedene Harnvolumen seinerseits über eine Grenze von rund 10 ml/min nicht hinausgeht. Wir hatten früher auseinander-gesetzt (J. FREY, 1950), daß eine Wasserdiurese darin bestehe, daß unabhängig von der Exkretion der gelösten Substanzen Wasser eliminiert wird; diese Ansicht wird durch das vorliegende Meßverfahren bestätigt.

Ordnen wir wieder das Zeitvolumen der C_{Σ} demjenigen des Harns zu (unter gleichzeitiger Heranziehung der Kochsalz-Clearance, C_{NaCl}), so ergibt sich in 11 H_2O -Versuchen an 6 Versuchspersonen ein gleiches

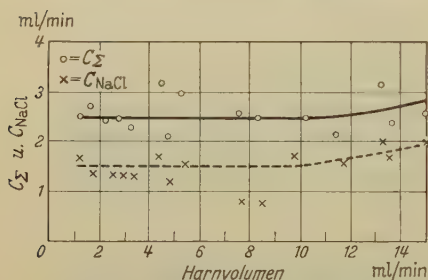


Abb. 3. Verhalten von C_{Σ} und C_{NaCl} gesunder Nieren bei Wasserdiuresen: Konstanz von C_{Σ} bei 2,5 und C_{NaCl} bei 1,5 ml/min bis zu einem Harnvolumen von 10 ml/min, dann mit weitersteigendem Harnvolumen leichte Erhöhung beider Clearancewerte.

Harnmenge von 0,8 ml/min unterschritten wird. Die Gefrierpunktsdepression des Harns (oder deren mOsmol/l) verhält sich bei der Wasserdiurese umgekehrt proportional der Harnmenge, ihr Wert ist also konstant. Nimmt man den Gefrierpunkt, so beträgt diese Konstante 1,4 (z. B. $-1,75^{\circ} \times 0,8$), wählt man mOsmol/l zur Kennzeichnung der Konzentrationen, so beträgt diese Konstante etwa 725 (Harnkonzentration 903 mOsmol/l).

III.

Im Gegensatz zu der umgekehrten Proportionalität von Harnmenge und Harnkonzentration unter den Absonderungsbedingungen der Wasserdiurese steht jene der *Filtrationsdiurese*. Wir sehen in 10 Diuresen an 10 Versuchspersonen, daß bei dieser Diureseart mit zunehmendem Harnzeitvolumen keine augmentation limit erreicht und eingehalten wird, sondern daß C_{Σ} mit zunehmender Diurese stark ansteigt (Abb. 4). Dieser stetige Anstieg ist auf eine gleichzeitige und mit dem zunehmenden Harnminutenvolumen sich steigernde Vermehrung der NaCl-Aus-

scheidung zurückzuführen. Die Filtrationsdiurese (hier mit Salyrgan + Coffein erzielt) zeichnet sich also durch eine mit steigender Harnflut anwachsende C_{Σ} aus, die vornehmlich durch gesteigerte Kochsalzelimination bedingt ist; dies wurde früher mehrfach auseinandergesetzt (J. FREY, 1950). Ihr Mechanismus ist also prinzipiell verschieden von der Wasserdürese, wie die Analyse von C_{Σ} ergibt.

Wie schon aus Abb. 4 hervorging, kann es bei stärkeren Filtrationsdiuresen vorkommen, daß C_{NaCl} größer ist als C_{Σ} . Dieses Verhalten wird sehr deutlich in einem Einzelversuch ausgedrückt (Abb. 5): Hier liegt auf der Höhe der Filtrationsdiurese C_{NaCl} mit 11,7 ml/min um 2,0 ml/min höher als C_{Σ} mit 9,7 ml/min, während zu Anfang und zu Ende der Diurese, wo das Harnzeitvolumen klein ist, C_{NaCl} wesentlich niedriger gefunden wird als C_{Σ} . Bei einer ebenfalls dargestellten Wasserdürese der gleichen Versuchsperson kommt dieses Verhalten beider Clearance-Werte ebenfalls zum Ausdruck. Das niedrigere Niveau von C_{NaCl} gegenüber C_{Σ} , das nur bei großen Harnvolumina unter den Bedingungen der Filtrationsdiurese aufgegeben wird, bedarf wiederum besonderer Aufmerksamkeit.



Abb. 4. Verhalten von C_{Σ} und C_{NaCl} gesunder Nieren bei Filtrationsdiuresen.

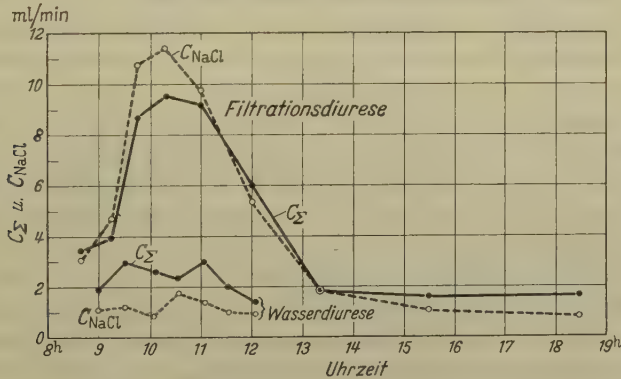


Abb. 5. C_{Σ} und C_{NaCl} bei Filtrations- und H_2O -diurese. Bei starker Filtrationsdiurese (9³⁰–11⁰⁰Uhr) ist C_{NaCl} größer als C_{Σ} , bei geringer Filtrationsdiurese kleiner.

Von den Harnfixa haben die Mineralien Ca, Na und Cl einen kleineren Clearance-Wert als C_{Σ} , wobei bei üblicher Harnabscheidung und -menge C_{Na} mit 0,95 ml/min und C_{Cl} mit 1,26 ml/min bestimmbar ist. Bei einer Blutkonzentration von 301 mOsmol/l ($\Delta = 0,56^\circ$) und 904 mOsmol/l im Harn ($\Delta = 1,68^\circ$) macht Ca davon etwas weniger als 1% im Blut und 0,5% im Harn aus, seine Clearance liegt um 1,13 ml/min: es wird deutlich tubulär reabsorbiert. Falls man annehmen will, daß das Volumen des Glomerulusfiltrats groß ist, wofür keine bindenden Beweise vorliegen, so wäre dementsprechend die Reabsorption von Ca sehr groß. — In diesem Zusammenhang sind jedoch Na^+ und Cl^- von Bedeutung. In mOsmol/l ausgedrückt, machen Na 48% und Cl 35% (zusammen 83%) der Blutbestandteile aus; im Harn finden sich Mengen von je rund 20% (zusammen 40% NaCl) vor. Die tubuläre Rückresorption dieser beiden Ionen ist demnach recht groß. Diese Feststellung läßt sich aus dem Vergleich der C_{NaCl} mit C_{Σ} treffen: so ist bei einem Harnvolumen von 1,0 ml/min das Verhältnis $C_{\Sigma}:C_{NaCl} = 2,5:1,5 = 1,65$ und bleibt mit steigender Wasserdiurese auf diesem Niveau, während das Verhältnis $C_{\Sigma}:C_{NaCl}$ bei Filtrationsdiuresen immer kleiner wird und schließlich bei großen Diuresen diesen Typs 1,0 unterschreitet, d. h. C_{NaCl} größer als C_{Σ} wird, wie wir sahen; das ist beim Vorliegen reiner Filtrationsdiuresen von einem Harnvolumen von 5 ml/min ab gewöhnlich der Fall, während Mischdiuresen (Wasser- + Filtrationsdiuresen) höhere Zahlen liefern. Unter den Bedingungen der Harnkonzentrierung liegt das Verhältnis von $C_{\Sigma}:C_{NaCl}$ bei 1,5—1,6 und steigt gegen ein Harnminutenvolumen von 1,0 ml zu nur noch wenig an (1,65).

IV.

Nehmen wir die Werte von 270 Clearance-Perioden, wozu Versuchspersonen jeder Altersklasse ohne diätetische oder medikamentöse Beeinflussung der Harnabsonderung dienten, und ordnen sie nach den jeweiligen Harnzeitvolumina in Gruppen von je 0,1, so ergibt sich ein charakteristischer Kurvenverlauf, der an einem größeren Kollektiv die vorher dargelegten Verhältnisse bestätigt (Abb. 6). Unterhalb eines Harnvolumens von 0,8 ml/min (= Harnkonzentrierung, Harnmenge 1200 ml/d) zeigt sich sowohl für C_{Σ} wie für C_{NaCl} ein stetig ansteigender und — abgesehen von einigen kleinen Abweichungen — glatter Kurvenverlauf. Oberhalb dieses Harnvolumens von 0,8 ml/min setzt dagegen eine erhebliche Streuung der Werte von C_{Σ} und C_{NaCl} ein, und zwar in einem Bereich, der durch die Werte der reinen Filtrationsdiurese nach oben sowie die der Wasserdiurese nach unten begrenzt wird. Wir hatten gezeigt, daß für die H_2O -diurese 2,5 ml/min für C_{Σ} und 1,5 ml/min für C_{NaCl} , für die Filtrationsdiurese 4,0 ml/min für C_{Σ} bei einem Harnvolumen von 2,0 ml/min und 3,5 ml/min für C_{NaCl} beim gleichen Harn-

volumen von 2,0 ml/min die typischen Kurvenverläufe sind. Bei dem zuletzt mitgeteilten Kollektiv von Versuchspersonen handelt es sich aber um solche, deren Nieren sich teils im Funktionszustand der Konzentrierung, teils in dem der reinen Wasser- oder Filtrationsdiurese oder der Mischdiurese befanden. Daher lag nur in einigen Fällen ein reiner Harnabsonderungstyp vor, während die Harnvermehrungen über 1,0 ml/min

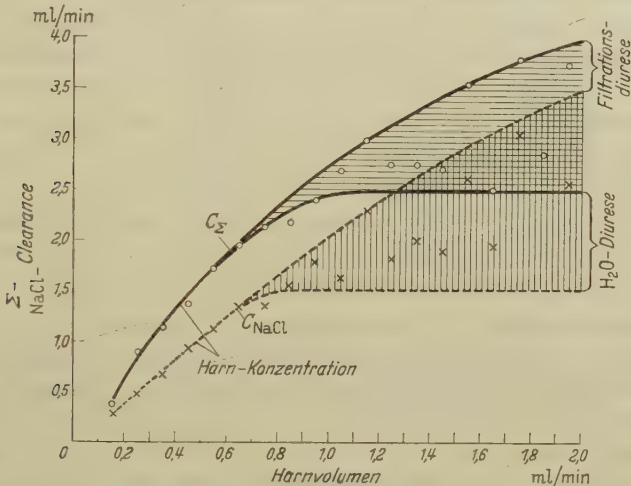


Abb. 6. 270 Clearanceperioden bei verschiedenen Arten der Harnabsonderung. Unter den Bedingungen der Harnkonzentrierung konstantes Anwachsen von C_{Σ} und C_{NaCl} mit dem Harnvolumen bis zu einem solchen von 0,8–1,0 ml/min. Bei Diuresen (Filtrationsdiurese, H_2O -Diurese, Mischdiurese) Streuung der Werte von C_{Σ} und C_{NaCl} zwischen den Begrenzungen durch reine Filtrations- und Wasserdiurese.

oder 1440 ml/d (— Diuresen) Mischdiuresen waren, also sowohl mit erhöhter glomerulärer Filtration wie mit erhöhter Ausscheidung reinen Wassers einhergehen.

Besprechung.

Mittels der Einführung der „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) konnte eine Differenzierung der Harnvermehrungen (= Diuresen) nach 2 Typen getroffen werden: 1. die Filtrationsdiurese und 2. die Wasserdiurese. Beim 1. Typ steigt C_{Σ} stetig mit zunehmendem Harnvolumen an, beim 2. Typ verbleibt C_{Σ} trotz ansteigendem Harnvolumen auf 2,5 ml/min. Durch diese Untersuchungen werden die Feststellungen von E. FREY (1906) über die Diuresearten bestätigt.

Die Zunahme von C_{Σ} mit steigender Harnausscheidung bei Filtrationsdiuresen kommt durch die gleichlaufende Zunahme von C_{NaCl} zustande, demjenigen Anteil der Harnfixa, der bei Filtrationsdiuresen

stark eliminiert wird, während hierbei die Ausscheidungsgröße von Harnstoff, der etwa 50% der Harnfixa ausmacht, möglicherweise nicht gesteigert sein soll (VAN SLYKE, AUSTIN u. STILLMANN, 1921). Aus diesem Grund können Filtrationsdiuresen, besonders wenn sie bei Nierenkrankheiten zwangsläufig ablaufen, eine erhebliche Verarmung des Organismus an Wasser und Kochsalz hervorrufen (Hydro-Saloprivie) (J. FREY, 1950), die therapeutisch ausgeglichen werden muß.

Bei einer reinen Wasserdiurese bis zu einem Harnzeitvolumen von 10 ml/min (14 l/d) besteht diese Gefahr nicht, da die Ausscheidung der Harnfixa mit Ausnahme des Lösungsmittels (H_2O) normal abläuft; dieser Mechanismus der Wasserdiurese wird an dem gleichbleibenden Niveau von C_x bei 2,5 ml/min/1,73 m² kenntlich, das sich zwischen einem Harnzeitvolumen von 1,0—10,0 ml/min nicht ändert.

Die vorliegenden Untersuchungen an Nierengesunden dienen weiterhin dazu, für gestörte Funktionen kranker Nieren Vergleiche zu gewinnen, die für die Klinik wichtig sind.

Bei Einbeziehung der Berechnungen und Überlegungen von v. KORÁNYI, daß zu einem über die Blutkonzentration eingedickten Harn, wie er üblicherweise abgesondert wird, eine bestimmte Wassermenge zugefügt werden müsse, um die Blutkonzentration (und damit die Konzentration des Glomerulusfiltrats) zu erreichen, kommt man zu ähnlichen Berechnungen, wie sie auch von WESSON u. ANSLOW, LADD und PAGE u. REEM vorgenommen wurden. Entsprechend der Clearance-Formel stellt die Differenz von C_x und Harnminutenvolumen dasjenige Wasserquantum dar, das tubulär reabsorbiert (Harnkonzentrierung) oder tubulär exzerniert (Wasserdiurese) werden muß, um die Konzentration des definitiven Harns zu erhalten; z. B. $C_x 2,5 = \frac{1,4 \times 1,0}{0,56}$, $C_x - V = 2,5 - 1,0 = 1,5$; $1,0 + 1,5 = 2,5$ ml/min. Wir bezeichnen die Menge reinen Wassers in ml/min, die aus dem isotonischen glomerulären Harn tubulär entfernt werden muß, um den definitiven Harn zu erhalten, als „ T_{H_2O} “; in dem eben gegebenen Beispiel beträgt $T_{H_2O} = 1,5$ ml/min.

Es ist von Wichtigkeit, T_{H_2O} für beide Diuresearten zu ermitteln. Bei Filtrationsdiuresen liegt T_{H_2O} zwischen —1,0 und —3,5 ml/min, bei Wasserdiuresen steigt T_{H_2O} linear mit dem Harnzeitvolumen, da C_x bis zu einem Harnvolumen von 10,0 ml/min auf einem Niveau von 2,5 ml/min verbleibt. Tab. 2 gibt hierüber Auskunft.

Basiert man auf der Gesamtheit der gelösten Substanzen und deren Konzentration im definitiven Harn, so läßt sich aus C_x die Größe der jeweiligen Wasserbearbeitung der Nieren (Reabsorption oder Exkretion durch die Tubuli) mittels T_{H_2O} derart definieren, daß diese durch das

Vorzeichen Minus = tubuläre Reabsorption von Wasser aus dem Kanälchenharn, oder durch das Vorzeichen Plus = tubuläre H_2O -exkretion meßbar verfolgt werden kann. Liegt eine reine Wasserdiurese vor, so muß sich demnach von einem Harnminutenvolumen von 3 ml ab

Tabelle 2.

Harnmenge ml/min	C_{Σ} ml/min	$T_{\text{H}_2\text{O}} (C_{\Sigma} - V)$ ml/min
1	2,5	— 1,5 (= tubulär
2	2,5	— 0,5 reabsorbiert)
3	2,5	+ 0,5
4	2,5	+ 1,5
5	2,5	+ 2,5
6	2,5	+ 3,5 (= tubulär
7	2,5	+ 4,5 excerniert
8	2,5	+ 5,5
9	2,5	+ 6,5
10	2,5	+ 7,5

(= 90 ml/30 min oder 4,3 l/d) eine Verdünnung des Harns unter das Blutniveau ergeben (Tab. 2), was auch tatsächlich der Fall ist.

Zusammenfassung.

Mittels der „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) werden die renalen Ausscheidungsbedingungen bei verschiedenen Funktionszuständen des Organpaares am Menschen untersucht. Es findet sich:

1. Bei Harnkonzentrierung ein mit dem Harnminutenvolumen zunehmenden Anstieg von C_{Σ} bis zu 2,5 ml/min;
2. bei Filtrationsdiurese ein weiterer Anstieg von C_{Σ} infolge Mit-ausscheidung großer NaCl-Mengen;
3. bei Wasserdiurese eine konstante C_{Σ} (bis zu einem Harnminutenvolumen von 10 ml);
4. bei Mischdiuresen (Filtrations- und H_2O -Diurese) ein verschieden hoher Anstieg von C_{Σ} mit dem Harnvolumen, jedoch nicht höher als bei reinen Filtrationsdiuresen.

Durch den aus C_{Σ} ableitbaren Begriff $T_{\text{H}_2\text{O}}$ (= tubuläre Wasserbearbeitung der Nieren) kann festgestellt werden, daß — außer natürlich bei Harnkonzentrierung — auch bei Filtrationsdiuresen üblicher Dimensionen eine Wasserreabsorption stattfindet, daß aber bei Wasserdiuresen eine H_2O -Exkretion vorliegt. $T_{\text{H}_2\text{O}}$ kann in ml/min gemessen werden.

Literatur.

ADDIS, T., u. F. WATANABE: J. of Biol. Chem. **28**, 251 (1916). — FREY, J.: Urologia **6**, 461 (1952). — FREY, E.: Pflügers Arch. **112**, 71 (1906). — FREY, J.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **58**, 200 (1952). — In E. u. J. FREY: Die Funktionen der gesunden und kranken Niere. S. 42—45. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — V. KORÁNYI, A.: Z. klin. Med. **33**, 1 (1897). — LADD, M.: Applied Physiol. **4**, 602 (1952). — PAGE, L. B., u. G. H. REEM: Amer. J. Physiol. **171**, 572 (1952). — SASS, D. E., u. S. BERTRAM: Chemiker-Ztg. **1950**, 734. — VAN SLYKE, D. D., J. F. MCINTOSH u. K. MØLLER: J. Clin. Invest. **6**, 467 (1928). — VAN SLYKE, D. D., W. C. AUSTIN u. E. . STILMANN: J. of Biol. Chem. **46**, 91 (1921). — SMITH, H. W.: The Kidney. New York: Oxford University Press 1951. — WESSON, L. G., u. W. P. ANSLOW jr.: Amer. J. Physiol. **170**, 255 (1952).

Prof. Dr. J. FREY, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Freiburg i. Br.

(Direktor: Prof. Dr. med. L. HEILMEYER).

Die renale Wasserausscheidung bei oraler Aufnahme größerer Wassermengen (Wasserdiurese).

Von

JOACHIM FREY und JOACHIM SCHIRMEISTER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. März 1954.)

Es konnte gezeigt werden³, daß eine der beiden Diuresearten⁴, nämlich die Wasserdiurese, dadurch charakterisiert ist, daß während ihres Ablaufs die Exkretion der gelösten Stoffe unabhängig von derjenigen des Lösungsmittels vor sich geht, daß also trotz zunehmender Harnmenge stets die gleiche Menge der Harnfixa zur Ausscheidung gelangt³. Demzufolge bewegt sich die von J. FREY⁵ angegebene „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) auf dem gleichen Niveau von etwa 2,5 ml/min, gleichgültig, ob es sich um eine steigende oder fallende Wasserdiurese handelt oder ob sie gering oder mittelstark ist. Die NaCl-Clearance nimmt ebenfalls einen gleichbleibenden Wert um 1,5 ml/min ein.

I.

Führt man eine große Wassermenge (3 Liter) oral zu, um dementsprechend eine starke Wasserdiurese zu erhalten, so werden beim gesunden Menschen Spitzenwerte des Harnvolumens erreicht, die über 10 ml/min liegen können, also 300 ml/30 min deutlich überschreiten.

Wie unsere Versuchsergebnisse (FREY u. SCHIRMEISTER³), kommt es nun bei diesen großen

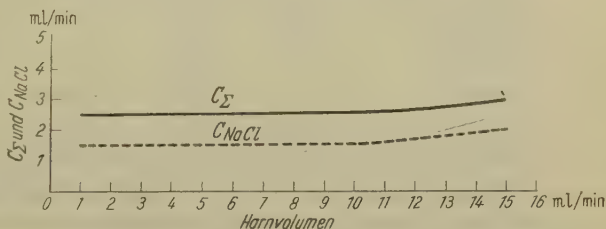


Abb. 1. Verhalten der „Clearance der Harnfixasumme“ (C_{Σ}) und der NaCl-Clearance (C_{NaCl}) bei kleinen, mittleren und großen Wasserdiuresen des Menschen: mit zunehmendem Harnzeitvolumen bleibt C_{Σ} auf 2,5 ml/min und C_{NaCl} auf 1,5 ml/min, um erst bei großen Wasserdiuresen (ab 10 ml/min Harn) langsam anzusteigen.

Harnabscheidungen, die unter den Bedingungen der Wasserdiurese erfolgen sollten, zu einer allmählich ansteigenden C_{Σ} und C_{NaCl} ,

z. B. bei einem Harnvolumen von 13,5 ml/min (etwa 400 ml/30 min) jetzt 3,0 ml/min C_{Σ} und 2,0 ml/min C_{NaCl} (Abb. 1). Dieser Anstieg der Exkretion der Harnfixa geht vornehmlich einer vermehrten Ausscheidung von

NaCl parallel; mit anderen Worten: bei großen Wasserdüresen kommt die zweite mögliche Diureseart hinzu, nämlich eine Filtrationsdiurese^{6,8} geringer Dimension, die sich neben anderen Charakteristika durch eine vermehrte NaCl-Exkretion auszeichnet. Das Ausmaß dieser aufgepfropften Filtrationsdiurese ist proportional der Harnmengenzunahme über 10 ml/min.

II.

Wegen der prinzipiellen Bedeutung dieser Beobachtung am Menschen wurden weitere Versuche mit Wasserdüresen an Mäusen angestellt, die nach dem von uns geübten Verfahren⁷ ausgeführt wurden: ein Kollektiv von 3 mal 6 Mäusen (17,5—26,5 g schwer) erhielt an 5 hintereinander liegenden Tagen zu jedem Wasserversuch 2 mal 0,4 ml oder 2 mal 0,7 ml oder 2 mal 1,0 ml Leitungswasser oral, wobei der Harn über 4 Std gesammelt und auf Menge, Gefrierpunkt, Chlor¹³ (als NaCl ausgedrückt) und Harnstoff¹ analysiert wurde. Die gegebenen Wassermengen würden bei einem 70 kgschweren Menschen 2,8 oder 3,5 oder 5,6 Liter entsprechen, sind also für die Maus ebenfalls erheblich.

Tab. 1 zeigt die Ergebnisse. Die Zahlen bedeuten den Mittelwert aus 5 Tagen und sind für 100 g Maus und 4 Std berechnet.

Tabelle 1. *Mengenangaben für 100 g Maus und 4 Std.*

Art der Versuchsperioden	1 Harnmenge ml	2 Delta Grad	3 C _Σ ml/min	4 T _{H₂O} ml/min	5 NaCl g	6 C _{NaCl} ml/min
Vorperiode	7,6	—1,48	20,0	—12,4	0,082	12,7
1. H ₂ O-Versuch	22,5	—0,62	24,4	— 1,9	0,082	16,5
2 × 0,4 ml	+196%	—58%	+22%		±0%	+30%
Zwischenper.	4,0	—2,19	15,7	—11,7	0,044	7,6
2. H ₂ O-Versuch	33,8	—0,41	24,7	+ 9,1	0,077	12,9
2 × 0,7 ml	+740%	—81%	+57%		+75%	+70%
Zwischenper.	4,7	—1,98	9,3	— 4,6	0,040	17,4
3. H ₂ O-Versuch	48,8	—0,41	33,8	+13,0	0,154	15,8
2 × 1,0 ml	+904%	—79%	+285%		+285%	+114%

Man erkennt, daß die Steigerung der oral gegebenen Wassermenge zwar das Harnvolumen ebenfalls erhöht, daß aber in zunehmendem Ausmaß eine Mitausscheidung von NaCl stattfindet (Spalte 5 und 6), wenn das oral gegebene Wasserquantum übergroß ist: bei der 2. Wasserbelastung + 75%, bei der 3. + 285% (bezogen auf die vorausgegangene Zwischenperiode). Dieses Verhalten kommt auch bei Berechnung der „Clearance der Harnfixasumme“ (C_Σ) und der NaCl-Clearance zum Ausdruck (Spalte 3 und 6): beim ersten Wasserversuch beträgt C_Σ + 22% und C_{NaCl} + 30%, beim zweiten Wasserversuch C_Σ + 57% und C_{NaCl} + 70%, beim dritten Wasserversuch C_Σ + 285% und C_{NaCl} + 114%

gegenüber der vorausgegangenen Periode, in der keine Wasserbelastungen vorgenommen wurden. Es kommt also auch im Tierversuch (Maus) zu der starken Wasserdiurese eine Filtrationsdiurese hinzu.

Zieht man die aus C_2 vorzunehmende Berechnung der „wasserarbeitenden Tubulusfunktion“ (T_{H_2O}) nach J. FREY³ heran (Spalte 4 der Tab. 1), so wird deutlich, daß bei kleiner Wassergabe (2mal 0,4 ml) noch eine tubuläre Wasserreabsorption vorliegt (1,9 ml/min), da das Harn-Delta 0,62° beträgt und damit der Harn konzentrierter als das Blut ist. Beim zweiten Wasserversuch (2mal 0,7 ml H_2O) und besonders beim dritten (2mal 1,0 ml H_2O) kommt die wasserausscheidende Funktion der Tubulusepithelien mit $T_{H_2O} + 9,1$ ml/min und 13,0 ml/min zum Ausdruck; diese Meßzahlen der Wasserexkretion wären noch größer, würden sich nicht gleichzeitig dabei Filtrationsdiuresen aufpfropfen, die vermehrt NaCl mitbringen.

Der eingangs wiedergegebene Befund am Menschen kann also auch am Tier (Maus) nachgewiesen und hier besonders deutlich gemacht werden: bei übergroßen Wasserdiuresen entsteht eine Filtrationsdiurese, die sich beimischt, kenntlich an der gleichzeitigen Mitexkretion von NaCl, während kleine und mittlere Wasserdiuresen (Abb. 1) diese Erscheinung nicht zeigen, sondern sich als reine Wasserexkretionen präsentieren.

III.

Es erhebt sich die Frage, worauf diese Beimischung einer Filtrationsdiurese zur Wasserdiurese, wenn letztere durch eine große Flüssigkeitsaufnahme stark dimensioniert ist, zustande kommt. Man könnte annehmen, daß es die Ablagerung von Wasser in den Geweben ist, die Chlornatrium mitreißt, das aber später wieder mit dem Wasser renal eliminiert wird. Bilanzmäßige Betrachtungen und Untersuchungen⁸ geben Anlaß zur Ablehnung einer solchen Vorstellung.

Mehrfach konnte experimentell gezeigt werden (J. FREY), daß ein Eingriff in den tubulären Stoffwechsel^{5, 6, 9, 10} ebenso Anlaß zur Filtrationsdiurese gibt wie die Überforderung des tubulären Transfermechanismus für irgend einen harnpflichtigen Stoff^{8, 11}. In den vorliegenden Experimenten ist dieser zu eliminierende Stoff das Wasser, welches dann, wenn es überreichlich den Nieren zur Exkretion angeboten wird, den Reiz zur Filtrationsdiurese abgibt; in gleicher Weise, nur in verschiedenem Ausmaß, tun dies Harnstoff, Inulin, Kreatinin, Diodrast, Glucose und andere Substanzen, die selbst keine oder nur geringe Gefäßwirkungen haben. Das Wasser ist in diesem Fall gleichermaßen harnpflichtiger Stoff und damit den übrigen Harnfixa als Exkredendum gleichgestellt, wie es außerdem auch deren Lösungsmittel ist. Daraus resultiert überhaupt die Möglichkeit der Wasserdiurese. Im übrigen ruft es aber genau wie andere

Harnfixa eine Filtrationsdiurese hervor, wenn die tubulären Transfermechanismen aus Gründen der Ausscheidung für diese Substanz überfordert werden. Die Filtrationsdiurese dagegen stellt ein völlig anderes Geschehen in der Niere dar, das mit der inneren Funktion zu tun hat, worauf hier nicht eingegangen wird.

Nach der heute üblichen Annahme findet beim Vorliegen einer H_2O -Diurese des Menschen unter Gleichbleiben der Filtratmenge von etwa 130 ml/min eine obligatorische Reabsorption eines Volumens von 80% und mehr des isotonischen Filtrats in den proximalen Tubuli statt, während die distalen Tubuli fakultativ

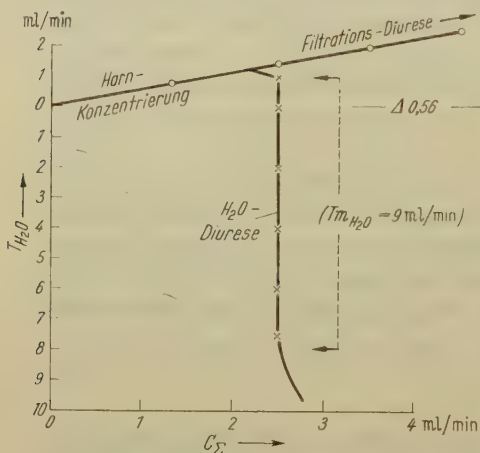


Abb. 2. Abhängigkeit der „wasserbearbeitenden Funktion“ der Nieren (T_{H_2O}) von der Clearance der Harnfixasumme (C_Σ): im Gegensatz zur Filtrationsdiurese (obere Kurve) bleibt bei Wasserdialysen T_{H_2O} (als Ausdruck der Wasserekkretion) bei einem C_Σ -Wert von 2,5 ml/min, um erst bei großen Wasserdialysen (ab 10 ml/min Harn) eine geringe Zunahme von C_Σ als Zeichen einer aufgepfropften Filtrationsdiurese aufzuweisen.

reabsorbieren, im Fall der H_2O -Diurese ein entsprechendes Quantum an gelösten Stoffen (SMITH¹⁴). Gegen diese Ansicht wendet sich in neuester Zeit PLATT¹², der einen Fall eines Nierenkranken mitteilt, bei dem nach dem Ergebnis der Kreatinin- und Inulin-clearance (nur etwa 8 ml/min) ein sehr kleines Filtratvolumen angenommen wurde, während auf der Höhe einer Wasserdialyse bei diesem Pat. ein Harnvolumen von 4,16 ml/min erschien, das etwa 50% der Filtratmenge ausmachte und nur $\frac{1}{2}$ isoton bezüglich des Natriums (70 mÄq./l) war; dieser Kranke müßte demnach eine stark hypertensive Lösung (216 mÄq./l) in den Tubuli reabsorbiert haben. Aus dieser Überlegung heraus, „daß die Tubulusfunktion in dieser Hinsicht viel wirksamer gewesen sein müßte als jemals beim Normalen nachgewiesen wurde“, stellt PLATT die übliche Ansicht, daß „die Wasserdialyse lediglich eine Frage von Filtration

und Reabsorption ist“, in Frage. „Wenn wir stattdessen einen Mechanismus für die tubuläre Sekretion von Wasser oder wahrscheinlicher einer hypotonen Flüssigkeit postulieren, können die beobachteten Tatsachen viel einfacher erklärt werden, und ich denke auch auf eine Art, die besser mit dem übereinstimmt, was wir von physiologischen Vorgängen wissen*.“ Auf den letzten Punkt ist besonders aufmerksam zu machen, denn Parenchymzellen sind durchaus in der Lage, Wasser auszustoßen; die Tubuluszellen zeigen keinen Anhaltspunkt, daß sie im Wasserstoffwechsel anderen Bedingungen folgen. Auch BRODSKY u. RAPOPORT² haben sich unlängst dafür ausgesprochen, daß „bei Personen mit Diabetes insipidus“, der eine Dauerwasserdialyse darstellt⁸, „eine tubuläre Sekretion von Wasser besser mit den Tatsachen übereinstimmt und weniger extravagant ist für die osmotische Arbeit der Nieren als eine Wasserekkretion lediglich durch Filtration und Reabsorption“ (Wortlaut PLATT¹²). Hiermit kommen die genannten Autoren zu Schlüssen, die

* Übersetzung d. Verf.

durch E. u. J. FREY⁸ seit langem aus ihren Experimenten abgeleitet wurden, nämlich zu der Annahme einer tubulären Exkretion von Wasser bei der Wasserdiurese, ein Ausscheidungsmodus, wie er auch für andere harnpflichtige Eigenstoffe bekannt ist.

Wir möchten aus diesen Gründen den mitgeteilten Zahlen von T_{H_2O} nicht etwa nur einen virtuellen, sondern vielmehr einen reellen Wert beimesen und sie als Meßmethode für die Wasserbearbeitung durch die Nieren anerkennen. Die maximale tubuläre Leistungsfähigkeit für die H_2O -Exkretion (Tm_{H_2O}) liegt nach den dargelegten Messungen für den gesunden Menschen bei etwa 9—10 ml H_2O pro min (Abb. 2), ehe sich eine Filtrationsdiurese hinzugesellt; bei sehr großen Wasserbelastungen geht aber Tm_{H_2O} noch weiter in die Höhe. Liegen Nierenkrankheiten vor, so verkleinert sich Tm_{H_2O} unter den Wert von 10 ml/min.

Zusammenfassung.

Durch Versuche am gesunden Menschen und am Tier (Maus) kann gezeigt werden, daß große Diuresen, die durch orale Wasseraufnahme zustandekommen und den Typ der Wasserdiurese darstellen, durch Hinzukommen einer Filtrationsdiurese charakterisiert sind, während kleine bis mittlere Wasserdiuresen (bis zu 10 ml/min Harn beim Menschen) nach dem reinen Typ dieser Harnmengenvermehrung verlaufen. Dieser Befund läßt sich entnehmen aus der absoluten NaCl-Ausscheidung mit dem Harn, der NaCl-Clearance und der Clearance der Harnfixasumme (C_x). Diese Aufpfropfung einer Filtrationsdiurese auf die Wasserdiurese ist Ausdruck einer Überforderung des tubulären Exkretionsmechanismus für Wasser, wie es für andere Harnfixa ebenfalls nachgewiesen werden kann.

Durch Messung der wasserbearbeitenden Funktion der Nieren (T_{H_2O}) gelingt es, weitere Einblicke in den Mechanismus der Wasserdiuresen zu gewinnen.

Literatur.

- ¹ BÖHM, F., u. G. GRÜNER: *Biochem. Z.* **287**, 65 (1936). — ² BRODSKY u. RAPOPORT: *Zit. nach PLATT* (1952). — ³ FREY, J., J. SCHIRMEISTER u. H. HENNING: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **223**, 107 (1954). — ⁴ FREY, E.: *Pflügers Arch.* **112**, 71 (1906). — ⁵ FREY, J.: *Urologia* **6**, 467 (1952). — ⁶ FREY, J.: *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* **58**, 200 (1952). — ⁷ FREY, J.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **216**, 473 (1952). — ⁸ FREY, J.: in E. u. J. FREY: *Die Funktionen der gesunden und kranken Niere*, S. 41/44, 114. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — ⁹ FREY, J.: 9. Vortragsreihe d. Augsburger Fortbildungstage f. prakt. Med. 1952. — ¹⁰ FREY, J.: *Urologia* (in Vorber.). — ¹¹ FREY, J.: *Dtsch. med. Wschr.* **1950**, 1183. — ¹² PLATT, R.: *Brit. Med. J.* **4773**, 1372 (1952). — ¹³ SASS, O. E., u. F. BETRAM: *Chemiker-Ztg.* **1950**, 734. — ¹⁴ SMITH, H. W.: *The kidney*, Oxford Univ. Press 1951.

Professor Dr. JOACHIM FREY, Freiburg/Br., Med. Klinik d. Univ.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. HEILMEYER).

Über Besonderheiten der Filtrationsdiurese.

Von

JOACHIM FREY und JOACHIM SCHIRMEISTER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. März 1954.)

Durch die „Clearance der Harnfixasumme“ (J. FREY^{1, 2}), die mit C_x bezeichnet wurde, konnte am Menschen gezeigt werden², daß in Bestätigung früherer tierexperimenteller Befunde von E. FREY³ eine Typisierung der Harnvermehrungen in Wasserdüresen und Filtrationsdüresen⁴ vorgenommen werden kann, dergestalt, daß bei einer reinen Wasserdürese bis zu einem Harnvolumen von etwa 10 ml/min C_x auf dem Niveau von

etwa 2,5 ml/min stehen bleibt. Bei Filtrationsdüresen dagegen findet ein stetiger Anstieg von C_x statt, der auf eine gesteigerte Mitausscheidung von NaCl zurückzuführen ist, wie Messungen der NaCl-Clearance zeigten. Dieser Anstieg von C_x unter den Bedingungen einer Filtrationsdürese weist aber einige Besonderheiten auf, die hier mitgeteilt werden sollen.

Die Versuche waren die gleichen wie diejenigen der früheren Mitteilung² (siehe dort Abb. 4 und 5); sie wurden an erwachsenen gesunden Menschen vorgenommen, die Coffein und Salyrgan zur Erzielung einer Filtrationsdürese erhalten hatten.

In Abb. 1 sind die aus den Düreseversuchen gewonnenen Werte von C_x gegen das jeweilige Harnminutenvolumen aufgetragen. Man erkennt, daß der Anstieg von

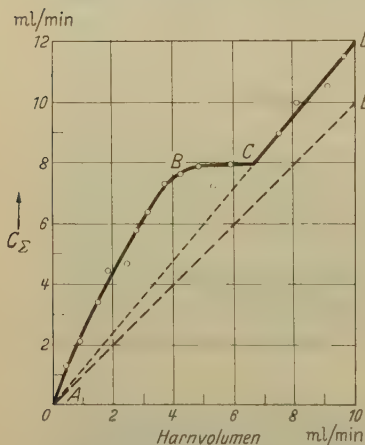


Abb. 1.

Abhängigkeit von C_x vom Harnzeitvolumen bei Filtrationsdüresen (Einzelheiten siehe Text).

C_x steiler erfolgt (A—B), als es einem Harn entsprechen würde, der ein reines Glomerulusfiltrat darstellt, wobei C_x = Harnminutenvolumen sein müßte (A—E). Von Punkt B—C verläuft C_x mit zunehmendem Harnvolumen waagerecht, also in einem Kurvenzug, wie er bei H_2O -Düresen gefunden wurde² (siehe dort Abb. 3). Von C ab wird mit zunehmendem Harnminutenvolumen ein linearer Kurvenverlauf deutlich (C—D), der weniger steil als A—B, aber steiler als A—E verläuft.

Aus den mit C_E gewonnenen Ergebnissen² läßt sich nach dem angegebenen Kurvenverlauf entnehmen, daß bei den hier auseinanderzusetzenden Filtrationsdiuresen mit steigender Harnmenge zuerst eine zunehmende Wasserreabsorption vorliegt, weil die osmolare Konzentration des Harns stärker zunimmt als das Harnminutenvolumen. Von einer Harnmenge von etwa 4 ml/min (Punkt B der Abb. 1) geht die Kurve (bis Punkt C bei etwa 6,5 ml/min Harn) in eine Horizontale über, was bedeutet, daß jetzt trotz zunehmendem Harnminutenvolumen kein weiterer Anstieg in der Ausscheidung der gelösten Stoffe, sondern nur ein solcher des Lösungsmittels (nämlich reines Wasser) stattfindet, wie es bei einer typischen Wasserdiurese gefunden wurde². Daß dabei noch ein erheblicher Filtrationsprozeß vorliegt, zeigen C_E und C_{NaCl} , die hierbei

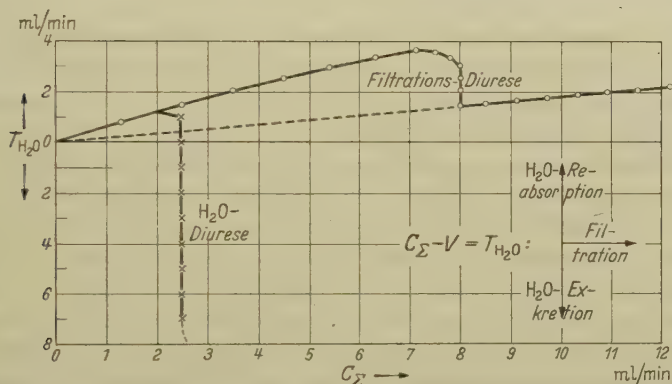


Abb. 2. Verhalten von T_{H_2O} (wasserbearbeitende Funktion der Nieren) und von C_E (Clearance der Harnfixsumme) bei Filtrationsdiuresen: zuerst H_2O -Reabsorption (50—60%), später H_2O -Exkretion (bei C_E 8 ml/min) und schließlich H_2O -Reabsorption in konstanter Stärke (17—18%).

mit 8,0 und 7,0 ml/min ermittelt wurden; bei der reinen H_2O -Diurese ist C_E bei einem Harnminutenvolumen zwischen ebenfalls 4—6 ml mit einem gleichbleibenden Stand von 2,5 ml/min analysiert worden. Dieser waagerechte Kurvenverlauf bedeutet, daß jetzt die Zunahme des Volumens des definitiven Harns nicht einer weiteren Steigerung der Filtration, sondern der Exkretion von H_2O zuzuschreiben ist, ein Befund, der überraschend ist. — Erreicht die Filtrationsdiurese noch größere Ausmaße, so wird nun ein stetiger Anstieg von C_E entsprechend der Zunahme des Harnminutenvolumens deutlich, wobei eine dem Harnminutenvolumen proportionale Reabsorption von Wasser vorliegt (17—18%).

Nehmen wir die Messung der tubulären Wasserbearbeitung durch die Nieren vor (J. FREY²), die sich aus C_E ergibt ($C_E - V = T_{H_2O}$), so findet sich folgendes (Abb. 2): bei einer Wasserdiurese nimmt T_{H_2O} bei einem C_E von 2,5 ml/min linear zu; nur bei übergroßen Wasserdiuresen erhöht sich C_E auf 3,0 und darüber⁵, was das Hinzukommen einer vermehrten

Filtration zur H_2O -Diurese bedeutet. — Bei den Filtrationsdiuresen steigt bei einem C_Z von 7,1 ml/min T_{H_2O} auf — 3,6 ml/min als Maximum, was eine deutliche tubuläre Wasser-Reabsorption bedeutet, dann fällt die Kurve stetig steiler werdend ab, um bei einem C_Z -Wert von 8,0 ml/min den stets gleichen Wert zu behalten, wobei T_{H_2O} von — 3,0 auf — 1,4 ml/min abfällt. Diese Senkrechte von T_{H_2O} bedeutet eine Proportionalität von Abnahme der Harnkonzentration und Zunahme der Harnmenge, wie es für die reine H_2O -Diurese typisch ist.

Diese kurvenmäßig zügig verlaufenden Änderungen von T_{H_2O} gegen C_Z , also der Messung der Wasserbearbeitung durch die Nieren und der Clearance der Harnfixasumme, lassen sofort an die Befunde von VERNEY¹⁴ denken, der bei Injektion von Salzlösungen in die A. carotis eine Reduktion des Harnflusses fand, die einer Abscheidung einer bestimmten Menge von antidiuretischem Hormon von Hypophyse-Hypothalamus entsprach. Diese Steuerung der Sekretion des Hormons durch den osmotischen Druck des Plasmas wird durch Osmorezeptoren vermittelt, die im Nucleus supraopticus gelegen seien. VERNEY interpretiert seine Befunde dahingehend, daß Äußerungen der Osmolarität im Sinne der Verdünnung und Konzentration des Plasmas ebensolche der Absonderung des antidiuretischen Prinzips bewirken, was Harnkonzentrierung oder Harnverdünnung (nach dem Prinzip der Wasserdiurese) zur Folge hat. Aus dem Kurvenverlauf von C_Z und T_{H_2O} (Abb. 1: A—B; Abb. 2: C_Z 2,5—7,0 ml/min) läßt sich eine Wasserreabsorption gut erkennen. Da für diesen Vorgang innerhalb der Nieren (Wassereinsparung) eine Ausstoßung des antidiuretischen Hormons aus Diencephalon-Hypophyse verantwortlich ist, sind diese Befunde eine Bestätigung derjenigen VERNEYS.

Bei Filtrationsdiuresen mit einem Harnvolumen von 1—4 ml/min (= 1,4—5,8 l/d) wird offensichtlich vermehrt Adiuretin abgesondert, was eine bei Zunahme der glomerulären Filtration steigende H_2O -Reabsorption in der Größenordnung von 1,5—3,5 ml/min nach sich zieht. Man kann annehmen, daß diese Erscheinung der Wahrung des Wassergehalts des Organismus dient, denn ein ausgeprägter Reiz zur Filtrationsdiurese vermag beträchtliche Wasser- und Kochsalzmengen durch die Nieren in Verlust geraten zu lassen.

Steigt die Filtrationsdiurese des Menschen zu einem Harnvolumen von 5—7 ml/min (7—9 l/d) an, so gesellt sich nun der andere Typ einer Diurese zur Filtrationsdiurese hinzu, eine Wasserdiurese, die mit einer Reduzierung der Adiuretinkonzentration des Plasmas verbunden ist (VERNEY¹³, MARX¹²). Dieser auffällige Befund einer Umschaltung der Nierenfunktion auf Wasserabgabe leistet einer Dehydratation des Organismus, die durch große Filtrationsdiuresen eingeleitet ist, noch weiteren Vorschub. Ob dieser Vorgang einer momentanen Erschöpfung des

Adiuretinvorrats der Hypophyse gleichkommt bei einem Stand der Filtrationsdiurese, die als erheblich bezeichnet werden kann, mag diskutiert werden; eine Titration des Hormongehalts wäre wünschenswert.

Der mit weiter zunehmendem Harnzeitvolumen erfolgende Anstieg von C_x und T_{H_2O} (Abb. 1 und 2) weist eine bemerkenswerte Gleichförmigkeit auf, die offenbar zwangsläufig bei einer Filtrationsdiurese jeglicher Quantität vorliegt, jedoch bei kleineren Harnzeitvolumina durch andere intrarenale Vorgänge überdeckt ist und nur bei sehr großen Filtrationsdiuresen zum Vorschein kommt. Der Kurvenverlauf von T_{H_2O} bringt ab einem Harnvolumen von etwa 7 ml/min nicht mehr ein biologisches Geschehen zum Ausdruck, sondern weist stereotype physikalische Merkmale auf (Abhängigkeit der H_2O -Reabsorption vom Filtrationsvolumen).

Eine weitere Frage soll nach diesen Befunden zur Diskussion gestellt werden. Löst die geänderte Konzentration von Adiuretin etwa die Filtrationsdiurese aus oder läuft diese nach eigenen Regeln ab, und ist der nachweisbare Konzentrationswechsel des Hormons nicht Ursache, sondern koordinierte und begleitende Erscheinung? Es liegen Befunde vor, nach denen durch Verabfolgung von Hypophysin eine Diurese ausgelöst werden kann (HOUSSAY¹⁰, FROMHERZ⁹), die sich als Filtrationsdiurese (E. FREY⁶, J. FREY⁷) typisieren läßt. Nach diesen Befunden wäre man berechtigt anzunehmen, daß auch die Filtrationsdiurese durch Hypophysin herbeigeführt wird, vorausgesetzt, daß alle Substanzen, die sie auslösen, eine solche extrarenale Wirkung besitzen, um eine zur Pitressinausschüttung führende Änderung der Blutosmolarität zu bewirken. Für eine ganze Reihe von Substanzen, die Filtrationsdiuresen auslösen, sind solche wasser- und salzmobilisierenden Wirkungen in den Geweben nachgewiesen worden (z. B. MALORNY¹¹ und viele andere). Ebenso liegt aber bei diesen Stoffen auch zweifellos eine direkte Nierenwirkung vor, die, verglichen mit dem „gewebsdiuretischen Effekt“, ungleich stärker ist. Vor allem konnten wir erkennen (J. FREY⁸), daß es der direkte Angriff an den Stoffwechselabläufen der Tubuluszellen ist, der eine starke Filtrationsdiurese auslöst. Aus diesen Gründen nehmen wir an, daß Pitressin nicht die Filtrationsdiuresen veranlaßt, sondern daß seine Konzentrationserhöhung bei einem Harnzeitvolumen von 5—7 ml/min Folge der Verarmung des Organismus an Wasser und Kochsalz ist; durch diese Hormonausschüttung soll bei Filtrationsdiuresen noch eine möglichst große Wasserreabsorption bedingt und somit die Salo-Hydroprivie vermindert werden. Die bei Filtrationsdiuresen nachweisbare verstärkte tubuläre H_2O -Reabsorption durch verstärkte Pitressinausschüttung wäre demgemäß nicht Ursache, sondern koordinierte Erscheinung. Daß bei gleichzeitigem Auftreten des Reizes zur Filtration (Harnstoff, Euphyllin, Coffein) und zur Harneindickung (Hypophysin) der erste Reiz sich nicht

aufheben läßt, wurde mehrfach gefunden und konnte auch durch Untersuchungen der intrarenalen Hämodynamik erhärtet werden (J. FREY⁴, Literatur dort).

Die Frage, warum bei bestimmten Graden der Filtrationsdiuresen eine H₂O-Diurese sichtbar wird, kann nicht beantwortet werden. Es könnte sein, daß durch die Diuresesubstanzen (hier Coffein, Theophyllin-Quecksilber) selbst die Reaktionsweise der Tubuluszellen auf Pitressin geändert wird, wenn die Anflutung an die Niere eine bestimmte Größe erreicht; auch könnte bei stärkeren Filtrationsdiuresen der Hormonvorrat aufgebraucht werden, so daß jetzt die Hormonkonzentration im Blut so niedrig liegt, daß die Nieren zur vermehrten Wasserekkretion nach dem Typ der Wasserdüurese veranlaßt werden; es gäbe aber auch noch andere Möglichkeiten, die hier nicht auseinandergesetzt werden sollen.

Zusammenfassung.

Es wurden am Menschen Diuresen nach dem Typ der Filtrationsdiuresen durch Coffein und Theophyllin-Quecksilber (Salyrgan) ausgelöst. Dabei fand sich, gemessen mit C_Σ und T_{H₂O} :

1. bei Filtrationsdiuresen kleineren Kalibers eine tubuläre H₂O-Reabsorption (50—60%);

2. bei solchen größeren Ausmaßes das Hinzukommen einer reinen Wasserdüurese;

3. bei starken Diuresen (bis 10 ml/min Harn) eine konstante H₂O-Reabsorption (17—18%).

Es werden Fragen der Pitressinsekretion beim Vorliegen einer Filtrationsdiurese erörtert und Gründe dargelegt für die Ansicht, daß nicht das Hormon diese Diureseart auslöst, sondern daß seine vermehrte Abscheidung ein koordinierter Vorgang ist, um den Organismus vor der Gefahr der Austrocknung zu bewahren.

Literatur.

- ¹ FREY, J.: *Urologia* 6, 467 (1952). — ² FREY, J., J. SCHIRMEISTER u. H. HENNING: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 223, 107 (1954). — ³ FREY, E.: *Pflügers Arch.* 112, 71 (1906). — ⁴ FREY, J.: In E. u. J. FREY, *Die Funktionen der gesunden und kranken Niere*, S. 113, 94/98. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — ⁵ FREY, J., u. J. SCHIRMEISTER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 223, 117 (1954). — ⁶ FREY, E.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 187, 221 (1937). — ⁷ FREY, J., u. R. BALDUS: In Vorbereitung. — ⁸ FREY, J.: *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 58, 200 (1952). — ⁹ FROMHERZ, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 100, 1 (1923). — ¹⁰ HOUSSAY, B. A., GALAN u. NEGRETE: *C. r. Soc. Biol. (Paris)* 83, 1248 (1921); 85, 33 (1921). — ¹¹ MALORNY, G.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 215, 619 (1952). — ¹² MARX, H.: *Klin. Wschr.* 1930 II, 2384. — *Der Wasserhaushalt d. ges. u. kranken Menschen*. Berlin: Springer 1935. — ¹³ VERNEY, E. B.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 205, 387 (1948). — ¹⁴ VERNEY, E. B.: *Proc. Soc. Roy. Edinburgh Sect. B* 99, 487 (1926). — *Lancet* 1929 I, 546.

Professor Dr. JOACHIM FREY, Freiburg/Br., Hugstetterstr., Med. Klinik d. Univ.

Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Frhr. v. KRESS).

Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien.

II. Mitteilung.

Verhalten der Bromsulphaleinausscheidung beim Kaninchen unter chronischer Allylformiatvergiftung.

Von

M. KESSEL, P. KÖRTGE und F. A. PEZOLD.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 24. März 1954.)

Allylformiat (AF) ist nicht nur ein Capillar-, sondern auch ein Zellgift. Der unmittelbare Eingriff in das Fermentsystem der Zelle steht nach FLECKENSTEIN sowie BENDA, LOCKER u. RISSEL im Vordergrund der AF-Intoxikation. EPPINGER konnte tierexperimentell mittels fortgesetzter Applikation kleinerer, nicht tödlicher Dosen von AF die Entwicklung von Leberveränderungen demonstrieren, die histologisch als Umbauvorgänge im Sinne einer atrophischen Cirrhose gedeutet wurden.

Da die chronische AF-Vergiftung in dieser Dosierung vorwiegend und in erster Linie zu einer Schädigung der Leberparenchymzelle führen soll, erschien es uns angebracht, zur Funktionsprüfung der Leber einen Test heranzuziehen, der empfindlich und in seinem Ablauf gut zu verfolgen ist. Zur Prüfung der exkretorischen Leberfunktion sehen wir auf Grund eigener klinischer Erprobung (BRAUN, MEX u. PEZOLD) den Bromsulphalein-(BSP)-Test als besonders geeignet an. Von ROSENTHAL u. WHITE 1925 in die klinische Funktionsdiagnostik eingeführt, wird er heute als einer der empfindlichsten chromodiagnostischen Teste angesehen.

Bromsulphalein ist das Natriumsalz der Phenoltetrabromphthaleinsulfosäure, das von WHITE nach der Prüfung zahlreicher Phthaleinfarbstoffe als besonders geeignet bezeichnet wird. Gemeinsam mit ROSENTHAL hat er diesen Farbstoff auf seine diagnostische Verwendbarkeit im Tierexperiment untersucht. ROSENTHAL u. LILLIE haben nachgewiesen, daß es sich im Wasser molekulardispers löst und zum größten Teil durch die Leber ausgeschieden wird. Beim Kaninchen erscheint der Farbstoff bereits 4 min nach i.v. Injektion in der Galle (BULMER), beim Menschen normalerweise innerhalb 5—15 min (LORBER u. SHAY, WIRTS, CAROLI u. TANASOGLU). Nach 1 Std befinden sich 72% (BULMER) bis 85% (ROSENTHAL u. WHITE, WIRTS) in der Galle. Aus der Diskrepanz zwischen dem BSP-Gehalt in der Galle und im Stuhl hat man auf eine extrahepatische Farbstoffelimination schließen wollen. Während sich in der Gallenflüssigkeit nach GIGES, MORSE, SHARON u. WYNN immerhin 80—100% des i.v. injizierten Farbstoffes wieder finden lassen, betrug

diese Quote in den Faeces nur 40—60%. Aber die gleichen Autoren konnten mittels bakterienhaltiger Stuhlsuspensionen zeigen, daß diese im Gegensatz zu bakterienfreien Stuhlfiltraten den Farbstoff bis zu einem gewissen Grad zerstören können.

BSP wird bei intakter Leber rasch eliminiert. Nach Leberexstirpation bleibt der Blutspiegel 15 und 30 min nach der Injektion gegenüber dem intakten Tier stark erhöht. Nach 80%iger Unterbindung der Leberdurchströmung — entsprechend dem Hauptlappen der Leber beim Kaninchen — wird nach 60 min noch etwa 65% des injizierten BSP im Blut retiniert (BULMER).

GOODMAN u. KINGSLEY haben die BSP-Clearance berechnet. Sie beträgt, in Kubikzentimeter Plasma/min ausgedrückt, normalerweise $5,33 \pm 0,75 \text{ cm}^3/\text{min}/\text{kg}$. Kein Wert lag unter $4,0 \text{ cm}^3/\text{min}/\text{kg}$. Bei Kranken mit Leberschäden, aber frei von Ikterus und Fieber, betrugen die Werte durchschnittlich $2,06 \pm 0,30 \text{ cm}^3/\text{min}/\text{kg}$. Kein Wert lag über $3,0 \text{ cm}^3/\text{min}/\text{kg}$. Schon 1947 hatte MYERS gezeigt, daß die Ergebnisse der von BRADLEY aufgestellten BSP-Clearance-Methode weitgehend mit einer Schätzungsmethode aus der Harnstoffproduktion übereinstimmen. Die Differenz ist signifikant. Analog konnten BRAUER, PESOTTI u. NICOSIA nachweisen, daß bei CCl_4 -vergifteten Tieren die BSP-Konzentration der Gallenflüssigkeit in der Zeiteinheit nur ein Drittel der Höhe bei normalen Tieren erreichte.

Es ist erwiesen, daß BSP eine leberpflichtige Substanz ist. Schon v. MÖLLENDORFF hatte mittels der Methode der Leberdurchströmung festgestellt, daß die Leber einen Farbstoff, den die Niere noch zu eliminieren vermag, nicht in die Galle ausscheidet. Ob auch i.v. zugeführtes BSP, wie viele andere Farbstoffe, obligatorisch zunächst von den KUPFFERSchen Sternzellen aufgenommen (SCHELLONG, HERLITZ, KLEIN u. LEWINSON, MILLS u. DRAGSTEDT, CANTAROW u. WIRTS), von da in die Leberparenchymzelle gelangt und erst durch sie in die Galle ausgeschieden wird, ist noch nicht restlos geklärt. Bei der bekannten Affinität von Farbstoffen zum RES (v. MÖLLENDORFF, JANČSÓ, SCHULEMANN) wäre ein solcher Ausscheidungsmodus durchaus denkbar. Die Sternzellen wurden daher auch lange Zeit als die Zuträgerzellen für die Leberzellen angesehen. Heute neigt man eher dazu, beiden Zellarten weitgehende Selbständigkeit zuzuerkennen. Im Gegensatz zu den gewöhnlichen Capillaren fehlt den Läppchensinusoiden ein geschlossenes Endothelrohr. Dafür liegen der Wand innen die KUPFFERSchen Sternzellen („Uferzellen“) an. Durch zahlreiche Lücken stehen die Leberzellen in unmittelbarer Berührung mit dem Blutserum. Bei Speicherungsversuchen mit Vitalfarbstoffen ließ sich zeigen, daß die direkt mit der Blutstrombahn in Kontakt befindlichen Leberzellen wesentlich mehr Einlagerungen aufwiesen als solche, die stark beladenen Sternzellen benachbart sind. Für diese Substanzen ist also die Zuträgerrolle der KUPFFER-Zellen abzulehnen (PFUHL). MENDELOFF geht auf Grund der Beobachtung, daß Tetrajodtetrachlorfluorescein (Bengalrot) nach i.v. Injektion nur in den polygonalen Leberzellen aufgenommen wird, sogar so weit, aus Analogiegründen den gleichen Aufnahmemechanismus für Bromsulphalein zu postulieren. KREBS u. BRAUER endlich gelang es, mittels radioaktiven Bromsulphaleins (markiert mit S^{35}) nachzuweisen, daß BSP nur in den Leberparenchymzellen lokalisiert ist. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen ROSENTHALS u. LILLIES, nach denen die Blockade des RES mittels kolloidalen Quarzes ohne Einfluß auf die BSP-Elimination aus dem Blut ist. Auch MENDELOFF, KRAMER, INGELFINGER u. BRADLEY sehen die BSP-Ausscheidung als eine aktive Leistung der „polygonalen Zellen“ der Leber an. Als dieser Auffassung entgegenstehend werden die Blockadeversuche mittels Tusche angeführt, in deren Auswirkung auf das RES der inhibitorische Effekt auf die BSP-Elimination gesehen wird. Nach den Befunden von VICTOR, VAN BUREN u. SMITH, daß die Tusche hepatotoxisch ist, und der Meinung von MENDELOFF, KRAMER, INGELFINGER u. BRADLEY, die die Hemm-

wirkung der Tusche darin sehen, daß die geschwollenen pigmentbeladenen KUPFFERSchen Sternzellen die Lebersinusoiden verschließen, müssen die Schlußfolgerungen aus den Blockierungsversuchen mit Tusche mit größter Zurückhaltung gezogen werden. Schließlich hat schon v. KUPFFER selbst betont, daß für den Stoffaustausch der Sternzellen mit der Galle der Umweg über die Leberzelle gar nicht nötig sei, da die Sternzellen mit ihren Ausläufern zwischen die Leberzellen bis an die Gallencapillaren heranreichen. Die KUPFFERSchen Sternzellen vermögen im Rahmen ihrer Aufgaben innerhalb des ganzen histiocytären Systems vor allem die Stoffe zu speichern, die nur sehr langsam ausgeschieden werden können. In dieser Eigenschaft erfüllen sie eine Schutzfunktion für das Leberparenchym gegenüber zu starker Belastung mit Fremdstoffen. Für den Eliminationsmechanismus ist neben der *Größe des Angebots der Zubringerweg*, die *Strömungsrichtung* (SIEGMUND) sowie die *Strömungsgeschwindigkeit* (Durchblutung) von Bedeutung (BRADLEY; CANTAROW, WIRTS, SNAPE u. MILLER). Die Resorptionsleistung des RES ist variabel. Sie kann bekanntlich aktiviert und bis zu einem gewissen Grad auch „blockiert“ werden. Bei einem Überangebot von Fremdstoffen werden noch andere, nicht dem RES angehörige Zellsysteme zur Elimination herangezogen.

Die von uns angewendeten Allylformiatdosen wirken sich, wie in einer späteren Mitteilung zu zeigen sein wird, in erster Linie als Zellgift aus. Es fanden sich Koagulation des Protoplasmas, Zerstörung der Interstitien und Dissoziation der Leberepithelbalken. Die Capillarendothelien sind durchweg widerstandsfähiger als die Leberepithelien. Nach Aufräumung der nekrotischen Gewebsanteile durch starke rundzellige Infiltration fand sich Wiederherstellung des Leberepithels aus den erhalten gebliebenen Parenchymresten. Gleichzeitig erfolgen reparatorische Vorgänge im Interstitium trotz weitergehender Giftwirkung. Da also eine erhebliche Gewebsschädigung erfolgt, wenn auch mit guter regenerativer Tendenz, erschien uns die Frage von nicht unerheblicher Bedeutung, wie sich der in der Klinik als relativ empfindlich angesehene BSP-Test beim Kaninchen unter experimenteller Allylformiatvergiftung verhält.

Eigene Untersuchungen¹.

I. Material und Technik.

Als Versuchstiere haben wir Kaninchen verwendet. Sie haben sich, wie bereits Mitteilung I² erwähnt, für unsere Zwecke als durchaus geeignet erwiesen. Die Erscheinungen der AF-Vergiftung lassen sich gut verfolgen. Kaninchenserum läßt sich papierelektrophoretisch einwandfrei auftrennen. Schon ROSENTHAL u. WHITE haben zur Durchführung ihrer BSP-Versuche Kaninchen bevorzugt, weil die Ausscheidung des Farbstoffes in die Galle bei ihnen rascher und kontinuierlicher als beim Hund erfolgt. Schließlich kam uns bei der Prüfung der BSP-Ausscheidung der Umstand zustatten, daß aus den Ohrvenen des Kaninchens mehrfach Blutentnahmen in kurzen Zeitabständen möglich sind.

Es wurden 18 gesunde Kaninchen im Gewicht von 2,5–5,0 kg, in 3 Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt, in den Versuch genommen und unter gleichen äußeren und diätetischen Bedingungen während der Versuchsdauer beobachtet. Art und Dosis der AF-Applikation werden in den einzelnen Versuchsreihen beschrieben.

¹ Unter experimenteller Mitarbeit von cand. med. F. DRESSLER.

² Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 123 (1954).

Bezüglich der Einzelheiten verweisen wir auf unsere Mitteilung I. Die Untersuchung der normalen BSP-Elimination erfolgte an 44 gesunden, unbehandelten Kaninchen. Unter diesen befanden sich die oben erwähnten, später in den AF-Versuch genommenen Tiere. Der Beobachtungszeitraum betrug 6 Monate.

Zur Prüfung der BSP-Ausscheidung wurde den Tieren nach vorheriger Abnahme eines Blutnüchternwertes 10 mg Bromthalein¹ pro Kilogramm Körpergewicht rasch *innerhalb 10 sec* i.v. injiziert. Diese Dosis wurde völlig reiz- und reaktionslos vertragen. Anschließend erfolgten die Blutentnahmen aus einer anderen Ohrvene, um eine Beeinflussung des Farbstoffindex durch lokal absorbiertes BSP zu vermeiden. In der Regel wurden innerhalb der ersten 10 min 3, im Zeitraum bis insgesamt 30 min post iniektionem weitere 3—4 Blutproben von je 2 cm³ durch Aspiration mit trockener Spritze entnommen. Die jeweilige Entnahmezeit wurde mit der Stoppuhr gemessen. Nach sofortiger Zentrifugierung wurden die Seren entsprechend den Angaben von BRAUN, MEX u. PEZOLD im Photozellencolorimeter nach HAVEMANN gemessen. Zum Unterschied gegenüber der Aufarbeitung von Humanserum wurden wegen der geringen Serummenge die gleichen Seren einmal ohne und anschließend mit NaOH-Zusatz gemessen. Die gefundenen Farbstoffwerte wurden in mg% angegeben. Hämolytische Sera mußten verworfen werden, da die Hämolyse einen erheblichen Störfaktor für die Colorimetrie des BSP-haltigen Blutes darstellt.

II. Ausgangswerte.

Die Normalwerte der BSP-Eliminierung wurden an 44 gesunden (19 männlichen und 25 weiblichen) unbehandelten Kaninchen ermittelt.

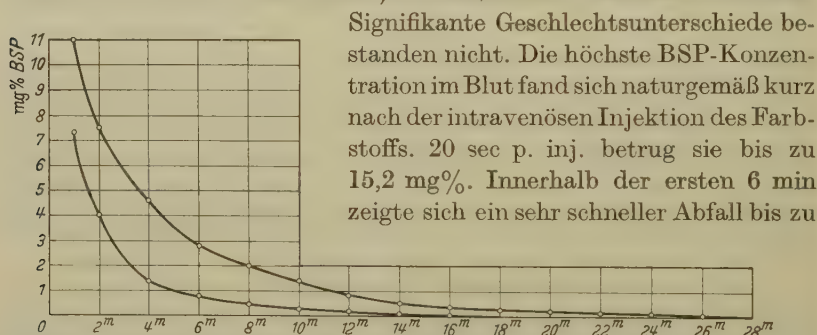


Abb. 1. Streuungsbreite des BSP-Konzentrationsabfalles im Blut bei normalen unbehandelten Kaninchen.

Werten von etwa 1,5 mg%. Der weitere Konzentrationsabfall verlief langsamer. Nach 30 min wurden im allgemeinen kein BSP oder nur quantitativ nicht mehr exakt bestimmbare Spuren im Serum gefunden. Trägt man die gefundenen BSP-Werte der gesunden unbehandelten Kaninchen in einem Koordinatennetz gegen die Entnahmezeiten auf, so ergibt sich der in Abb. 1 dargestellte Streubereich. Er liegt im Bereich der biologischen Fehler, so daß eine daraus errechnete Mittelwertskurve als normale BSP-Eliminierung bei gesunden Kaninchen nach der von uns gewählten

¹ 5% ige wäßrige Lösung von Phenoltetrabromphthaleindinatriumsulfonat (Mol. Gew. 838,0, pH-Bereich der Lösung 4,5—5,5) der Firma Merck (Darmstadt).

Dosierung von 10 mg/kg BSP angesehen werden kann. Unter Zugrundelegung einer BSP-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht und eines mittleren Plasmavolumens beim Kaninchen von 38,3 cm³/kg Körpergewicht (ARMIN, GRANT, PELS u. REEVE) würde die maximal erreichbare Plasmakonzentration des Farbstoffs theoretisch 25,8 mg% betragen. Bei unseren Untersuchungen wurde etwa $\frac{1}{2}$ min nach der intravenösen Injektion eine maximale Konzentration von 15 mg% gefunden.

Die Entnahmezeiten sind auf Minuten abgerundet. Aufgetragen sind die Maximal- bzw. Minimalkonzentrationen für den gleichen Zeitpunkt. Die beiden Kurven sind durch je 11 Meßpunkte gesichert. Bei jedem Tier erfolgten durchschnittlich 6 Blutentnahmen innerhalb von 30 min nach der BSP-Zufuhr. Die gefundenen Werte liegen mit vereinzelt Ausnahmen durchweg innerhalb des Streubereichs.

Der schnell abfallende erste und der langsam abfallende zweite Teil der Kurve deutet auf einen zweiphasischen Verlauf des BSP-Konzentrationsabfalles im Blut hin. Schon ROSENTHAL hatte das anfänglich rasche Absinken des Blutspiegels nach der Farbstoffinjektion auf Diffusionsvorgänge in die Körpergewebe zurückgeführt. Der erste Abschnitt entspricht also der Verteilung der Substanz im strömenden Blut (Mischungszeit) und weiter der Diffusion in Gefäßbezirke geringerer Strömungsgeschwindigkeit (Blutspeicher, Ruhecapillaren). Nach Erreichung des Verteilungsgleichgewichtes kommt als Ausdruck der jetzt allein wirksamen Eliminationsvorgänge die langsam abfallende zweite Phase des Kurvenverlaufs zustande. Die Tiefe des initialen Kurvensturzes wird als Maß für die Ausgiebigkeit der Gewebsdifusion gewertet (DOST). In unseren Untersuchungen beginnt der zweite Kurvenabschnitt etwa bei dem 5—6 Minutenwert. In Wirklichkeit überschneiden sich beide Phasen, indem die alsbald nach der intravenösen BSP-Zufuhr stattfindende Elimination die Verteilungsvorgänge überdeckt.

Die von uns verwendete Farbstoffdosis von 10 mg/kg Körpergewicht war doppelt so hoch wie die in der Klinik übliche (BRAUN, MEX u. PEZOLD). Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß ein Teil der zugeführten BSP-Menge auf seiner Passage durch den Körperkreislauf vom extrahepatischen RES aufgenommen und somit wenigstens zunächst dem Eliminationsorgan ferngehalten wird. Es sollte aber der Leber eine genügend große Farbstoffmenge angeboten werden. Diese Dosiserhöhung erschien uns um so eher erlaubt, als so erfahrene Experimentatoren wie MOSES, CRITCHFIELD u. THOMAS nachgewiesen hatten, daß für den Dosissbereich von 5—20 mg/kg praktisch die gleichen quantitativen Verhältnisse bei der BSP-Elimination vorliegen.

Die Bewertung eines BSP-Testes als pathologisch ist unter Zugrundelegung des gefundenen 30 Minutengrenzwertes erfolgt. Er bildet die Basis für die Beurteilung der unter AF-Einwirkung verzögerten BSP-Elimination. Es erscheint uns wichtig, auf diese besonderen Verhältnisse beim Kaninchen schon hier ausdrücklich hinzuweisen. Über die von uns aufgestellte Versuchsanordnung und die dabei angewendete Methodik haben wir in der Literatur keine vergleichbaren Angaben finden können.

III. Untersuchungen unter AF-Zufuhr.

Versuchsreihe I (20 mg AF pro kg et die). Bei dieser Versuchsreihe von 6 Tieren wurden 20 mg AF pro kg täglich subcutan unter die Rückenhaut appliziert. Kein Tier zeigte auf die täglichen AF-Gaben auffällige Reaktionen, das Allgemeinbefinden veränderte sich auch im Initialstadium nicht wesentlich. Die Gewichte verhielten sich bis auf einen anfänglichen Verlust, der nachher ausgeglichen wurde, unauffällig. Lediglich gegen Ende der Versuchsperiode kam es zu Schwankungen in der Gewichtskurve. Der unter AF-Applikation bekannte Haarausfall wurde ebenfalls beobachtet. Bei einigen Tieren traten zeitweise Nekrosen an den Injektionsstellen auf, die jedoch nie die Größe eines 10 Pfennigstückes überschritten und nach kurzem Bestehen trotz Weiterführung der Vergiftung abheilten. Durch diese Nekrosen wurden weder Allgemeinbefinden, Gewicht, noch die BSP-Elimination beeinträchtigt. Die Versuchsperiode erstreckte sich maximal bis zu 106 Tagen nach Beginn der AF-Zufuhr. Die Tiere wurden durch Nackenschlag und Eröffnung der Carotiden getötet. Einen Überblick über diese Versuchsreihe gibt die Tab. 1.

Die Eliminierungskurven sämtlicher Tiere (mit einer Ausnahme) in der Tab. 1 zeigen einen normalen Verlauf. Das heißt, die langdauernd durchgeführte AF-Applikation von 20 mg blieb ohne Einfluß auf die BSP-Eliminierung. Lediglich ein Tier (Nr. 18) wies am 19. Tag der AF-Zufuhr nach 55 min noch 0,15 mg% BSP im Serum auf. Bei erneuter Prüfung der BSP-Elimination am 40. und 83. Tag konnte nach 30 min kein Farbstoff mehr im Serum nachgewiesen werden.

Versuchsreihe II (30 mg AF pro kg et die). Es wurden 6 Tiere mit täglichen subcutanen Injektionen von 30 mg AF pro kg vergiftet. Sie zeigten wesentlich schwerere Allgemeinerscheinungen, besonders im Anfangsstadium der AF-Zufuhr. Sie machten einen deutlich kranken Eindruck, reagierten relativ schwach auf äußere Reize und die Freßlust ließ nach. Dementsprechend zeigten die Gewichtskurven einen nahezu kontinuierlichen Abfall. Nach Absetzen des AF kam es bei den 3 überlebenden Tieren zu einem Wiederanstieg. Die Tiere zeigten wiederum anfänglich Haarausfall und teilweise Hautnekrosenbildung an den Injektionsstellen, die jedoch trotz weitergeführter AF-Zufuhr zur Abheilung kamen. Die bereits früh einsetzende Bluteindickung führte zu außerordentlicher Erschwerung der Blutentnahmen. Diese war teilweise erst 30 min nach intravenöser BSP-Zufuhr wieder möglich. Man kann aber den 30 Minutengrenzwert nach unseren oben dargelegten Untersuchungen für die Beurteilung der BSP-Ausscheidung aus dem strömendem Blut unter pathologischen Bedingungen als ausreichend ansehen. Je ein Tier verstarb spontan am 17., 37. und 65. Tag. Bei den 3 überlebenden wurde die AF-Zufuhr so lange fortgesetzt, bis die BSP-Elimination deutlich von

Tabelle 1. Verhalten des Serum-BSP-Gehaltes bei langdauernder Zufuhr von 20 mg AF pro kg et die.

Tier Nr.	Versuchstag	Gewicht in g	BSP-Index nach 30 m in mg%	Bemerkungen
12 ♀	0	2950	0	
	13	2990	0	
	37	3260	0	
	49	3550	0	
	90	3650	0	Spontan verstorben nach 98 Tagen
	98	2960	./.	
13 ♀	0	3050	0	
	13	3090	0	
	37	3200	0	
	49	3410	0	
	90	2830	0	
	106	3030	./.	getötet
14 ♀	0	2850	0	
	20	3020	0	
	38	3060	0	
	47	3280	0	
	88	3200	undurchf.	
	103	3410	./.	getötet
15 ♀	0	3110	0	
	20	3080	0	
	38	2770	0	
	47	3280	0	
	88	3180	0	
	103	2980	./.	getötet
16 ♀	0	2500	0	
	19	2570	undurchf.	weitere Abnahmen technisch unmöglich
	35	2650	0	
18 ♀	0	3760	0	
	19	3820	0,24 (35 ^m)	0,15 (44 ^m) 0,15 (55 ^m)
	40	3940	0	
	83	4310	0	
	96	4220	./.	getötet

der Norm abwich (die Tiere hatten sich zu diesem Zeitpunkt von dem initialen Schock erholt und zeigten keine Auffälligkeiten mehr). Darauf wurde das AF abgesetzt und während einer „Reparationsphase“ von 3 Monaten die exkretorische Funktion der Leber für BSP weiter geprüft. Anschließend wurden die Tiere durch Nackenschlag und Carotiden-eröffnung getötet und die Organe der histologischen Untersuchung zugeführt. Einen Überblick über die AF-Applikation, die Versuchstage und die Gewichtsverhältnisse sowie die BSP-Elimination gibt die Tab. 2.

Tabelle 2. Verhalten des Serum-BSP-Gehaltes bei und nach langdauernder Zufuhr von 30 mg AF pro kg et die.

Tier Nr.	AF-Dosis (pro kg et die) mg	Versuchstag	Gewicht in g	BSP-Gehalt in mg% 30 m später	Bemerkungen
20 ♀	30	0	3140	0	
		7	2715	undurchführbar	
		24	2880	0	
		66	2860	0	
		102	2760	0,1 0,1 0,05 0,0 (30m) (41m) (50m) (62m)	
		109	2750	0	
	AF abgesetzt	135 (27)	2900	0,25 0,1 0 (31m) (41m) (50m)	
		196 (89)	3380	0	getötet
23 ♀	30	0	2780	0	spontan am 37. Tag verstorben
		7	2450	undurchführbar	
		24	2440	undurchführbar	
		37	1810		
27 ♂	30	0	3380	0	spontan am 17. Tag verstorben
		17	3000		
28 ♂	30	0	4660	0	
		36	4330	undurchführbar	
		63	3820	1,95 0,35 0,20 (32m) (50m) (71m)	
	AF abgesetzt	79	3730		
		108 (30)	3300	0,35 0,25 0 (31m) (40m) (60m)	
		168 (90)	3800	0,1 0,05 (30m) (45m)	
30 ♂	30	0	5090	0	spontan am 65. Tag verstorben
		36	4300	0,17 (34m)	
		63	3470	0,75 0,08 (37m) (59m)	
		65	3360		
31 ♂	30	0	4150	0	
		31	3780	0,17 0,05 (34m) (54m)	
		58	3360	0,35 0,25 0,20 0,05 (30m) (39m) (52m) (61m)	
	AF abgesetzt	73	3250		
		102 (30)	3160	0,12 0 (31m) (41m)	
		163 (91)	3350	0	
					getötet

Es zeigt sich, daß bei laufender subcutaner Zufuhr von 30 mg AF pro kg et die eine Verzögerung des Eliminierungsvorganges eintritt. Es fanden sich nach 30 min und später im Serum noch meßbare Farbstoffmengen. Auch nach Absetzen des AF blieb die Eliminierungsfähigkeit gestört.

Etwa 3 Monate nach Absetzen der AF-Zufuhr hatten sich jedoch die BSP-Kurven wieder normalisiert. Die Eliminationsverhältnisse im einzelnen gibt die Tab. 3 wieder. Lediglich ein Tier (Nr. 28) zeigte 3 Monate nach Abbruch der AF-Zufuhr noch leicht erhöhte Farbstoffwerte im Serum, die jedoch im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen wesentlich niedriger lagen. Auch die Bluteindickung hatte sich im allgemeinen zurückgebildet.

Tabelle 3. Verlauf der BSP-Elimination vor, während und nach AF-Applikation von 30 mg/kg et die. (Minuten abgerundet.)

Tier Nr.	Zeit min	vor AF-Vergiftung BSP in mg%	auf der Höhe der AF-Vergiftung BSP in mg%	nach Ende der „Reparationsphase“ BSP in mg%
20		0. Tag	102. Tag	196. Tag
	4	4,85	—	—
	5	—	2,95	3,55
	10	1,4	1,35	0,85
	15	0,15	0	—
	20	—	0,2	0,1
	28	0,05	—	0
	30	—	0,1	—
	40	—	0,1	—
	50	—	0,05	—
	60	—	0	—
28		0. Tag	63. Tag	168. Tag
	5	3,45	—	3,55
	12	0,37	—	0,7
	18	0,15	—	0,25
	30	0	1,95	0,1
	45	—	—	0,05
	50	—	0,35	—
	70	—	0,2	—
31		0. Tag	58. Tag	163. Tag
	5	2,2	—	2,8
	10	0,85	2,45	0,55
	20	0,1	0,5	—
	30	0	0,35	0
	40	—	0,25	—
	50	—	0,2	—
	60	—	0,05	—

Die gleichzeitig weiter durchgeführten Kontrollen der Serumeiweißwerte mittels Papirelektrophorese sowie die orientierenden Untersuchungen der Cadmium-sulfatreaktion und des WELTMANNschen Koagulationsbandes zeigten im Vergleich zu den Ausgangswerten eine Normalisierung des Verhaltens.

Versuchsreihe III. (40 mg AF pro kg et die). Die 6 mit 40 mg AF vergifteten Tiere kamen sämtlich innerhalb 8 Tagen unter schwersten Allgemein- und Krampferscheinungen ad exitum. Sie fraßen bis zu ihrem Tode kaum. Infolge der hochgradigen Bluteindickung war es nicht möglich, mehrere fortlaufende Blutentnahmen durchzuführen. Es gelang daher nicht, das Verhalten der BSP-Ausscheidung bei dieser Versuchsreihe zu kontrollieren.

Besprechung der Ergebnisse.

Unsere Eliminierungskurven für intravenös injiziertes BSP beim Kaninchen zeigen einen Verlauf, der nicht vollständig den beim Menschen gefundenen Verhältnissen gleicht. Wir fanden *bei fast allen unbehandelten Tieren nach spätestens 30 min kein BSP* oder nur noch geringe, quantitativ nicht mehr bestimmbare Spuren *im Serum*. Es erscheint uns daher *angängig*, für das Kaninchen bei Verwendung einer Belastungsdosis von 10 mg/kg den *30 Minuten-Wert* als kritischen Grenzwert der BSP-Elimination aus dem strömenden Blut zu wählen.

Geht man von den Befunden von MENDELOFF u. Mitarb. an Tieren (u. a. auch Kaninchen) aus, die eine Abhängigkeit der BSP-Eliminierungsgeschwindigkeit von der injizierten Dosis nachgewiesen haben, so wäre auf die von uns vorgenommene Dosiserhöhung eine längere Ausscheidungszeit zu erwarten gewesen. Die Autoren hatten als Grenzwert für die vollständige Ausscheidung des BSP aus dem Blut für die Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht eine Zeitdauer von 20 min, für die (heute in der Klinik meist übliche) Dosis von 5 mg/kg aber 45 min gefunden. Demgegenüber hatten ROSENTHAL u. WHITE in experimentellen Untersuchungen mit 5 mg/kg den Nachweis von BSP im Blut nach 30 min als *direktes Maß für eine Leberschädigung* angesehen.

Der somit im Vergleich zum Menschen sehr rasche Konzentrationsabfall des BSP im Blut des Kaninchens dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Kreislaufzeit kürzer und die Blutmenge geringer ist, sowie die Stoffwechselvorgänge rascher ablaufen als beim Menschen. Aus dem allgemeinen Kurvenverlauf, insbesondere der Höhe der Frühwerte möchten wir für unsere unter AF-Einwirkung durchgeführten Untersuchungen keine bindenden Schlüsse ziehen, da diese Frühwerte wahrscheinlich von Herz- und Kreislaufverhältnissen und damit der Durchströmungsgeschwindigkeit durch das Eliminationsorgan abhängig sind, die wir nicht näher beurteilen konnten. Der 30 Minutengrenzwert ist dagegen exakt reproduzierbar.

Bei Verwendung einer täglichen AF-Dosis von 20 mg pro kg et die ließ sich trotz langdauernd fortgesetzter Giftzufuhr (teilweise bis zu 3 Monaten) kein pathologischer Ausfall des BSP-Testes erreichen. Nach Erhöhung

der Tagesdosis AF auf 30 mg/kg kam es zu einer signifikanten reversiblen Verzögerung der BSP-Elimination aus dem Blut. Eine Steigerung der Tagesdosis auf 40 mg/kg führte zu schweren allgemeinen Störungen.

Es ist aus der experimentellen Pathologie bekannt, daß die üblichen Leberfunktionsproben erst beim Verlust von etwa zwei Dritteln des Leberparenchyms verändert werden. Dabei muß allerdings vorausgesetzt werden, daß der Rest des Lebergewebes funktionell intakt ist. Bei der menschlichen Hepatitis und Lebercirrhose ist der pathologische BSP-Test ein Regelbefund, wie an einem umfangreichen klinischen Material allenthalben gezeigt worden ist. Während die intakte menschliche Leber den Farbstoff rasch ausscheidet, ist bei Leberparenchymerkrankungen eine mehr oder weniger große Farbstoffretention im Blut nachweisbar.

Die Vorstellung von der Leber als alleinigem Eliminationsort für das BSP wird von COHN, LEVINE u. STREICHER bestritten. Diese Autoren stellten an 2 hepatektomierten und nephrektomierten *Hunden* fest, daß auch die „peripheren Gewebe“ in der Lage sind, 25–30% des injizierten Farbstoffs aus dem Blut zu entfernen. Diese Elimination erfolgte ebenso rasch wie beim intakten Tier. WERNER u. HORVATH bestimmten in Übereinstimmung mit BRAUER, PESOTTI u. NICOSIA den *extrahepatischen BSP-Schwund* mit annähernd 20%. Auch GIGES u. Mitarb. postulieren auf Grund von Versuchen an *Hunden* und *Ratten* das Vorhandensein extrahepatischer Eliminationsmechanismen für BSP. Sie prüften die Versuche von SNELL, GREENE u. ROWNTREE sowie CANTAROW u. STEWART an *Hunden* und *Ratten* nach und fanden, daß *nach totaler Unterbindung des Ductus choledochus* 30–50% des Farbstoffs über die Nieren ausgeschieden werden. COHN, LEVINE u. STREICHER fanden bei einer zweiten Versuchsreihe an 3 Gallenfistelhunden größere Differenzen von Tier zu Tier. Sie bewegten sich von 23–79% des in der Galle wiedergefundenen Farbstoffs. Die Geschwindigkeit, mit der das Bromsulphalein aus dem Serum dieser Tiere verschwindet, weist darauf hin, daß nach Unterbindung des Gallenabflusses bei den genannten Versuchstieren der Farbstoff den Weg über die Nieren einschlagen kann. Wird auch noch die Niere ausgeschaltet, verläßt der Farbstoff dennoch das Blut. In diesem Fall tritt wohl als letzte Kompensationsmaßnahme das histiocytäre System in Funktion. Über den Eliminierungsart sagen diese Versuche aber nichts aus. Offensichtlich differieren die erwähnten tierversuchsmäßig gewonnenen Ergebnisse deutlich von den am Menschen erhobenen Befunden und sind nach den Autoren selbst nicht auf ihn übertragbar. MASON, HAWLEY u. SMITH konnten bei Clearance-Versuchen nachweisen, daß dieser Farbstoffschwund besonders schnell in der ersten Phase des Versuches eintritt bis zur Erreichung eines konstanten Serumspiegels. Da sie weder extracellulär, noch extravasculär BSP nachweisen konnten, auch nicht nach intraperitonealer Injektion hyperotonischer Lösungen, schließen sie auf einen cellulären Absorptionsmechanismus (vielleicht RES-Funktion) in dieser ersten Phase. Auch der MENDELOFFSche Arbeitskreis ist der Ansicht, beim Menschen könne in Anbetracht der rapiden BSP-Elimination durch die normale Leber die extrahepatische Ausscheidung als viel zu langsam arbeitend praktisch vernachlässigt werden. Der erwähnte „Schwund“ des BSP bei Bilanzversuchen könnte schließlich auch in den Befunden von BRAUER, KREBS u. PESOTTI eine Erklärung finden, daß BSP unter bestimmten Umständen in der Leber chemisch verändert werden kann. Es kann abschließend festgestellt werden, daß gewichtige Befunde für das Vorliegen einer initialen extrahepatischen Schwundrate von etwa 20% einer einmalig injizierten BSP-Dosis vorliegen. Mit unserer Dosiserhöhung von 5 auf 10 mg/kg Körpergewicht glauben wir, daß beim Durchgang des Farbstoffs durch die Leber noch eine genügende Farbstoffkonzentration vorhanden ist, die im Sinne einer Belastung der exkretorischen Funktion der Leber wirkt.

Schlußfolgerungen.

1. Die Kaninchenleber ist gegenüber chronischer Allylformiatintoxikation relativ resistent.
2. Nur mit höheren, protrahiert gegebenen AF-Dosen ist es möglich, einen pathologischen Ausfall des BSP-Testes, der in der menschlichen Pathologie als relativ empfindlich gilt, hervorzurufen.
3. Die exkretorische Funktion der Leber des Kaninchens wird, wenigstens bezüglich des BSP, mit den von uns verwendeten AF-Dosen nicht nennenswert beeinträchtigt.
4. Sie erholt sich innerhalb einer „Reparationsphase“ von längstens 3 Monaten.

Literatur.

- ARNIM, J., R. T. GRANT, H. PELS and E. B. REEVE: The plasma, cell and blood volumes of Albino Rabbits as estimated by the dye (T 1824) and ^{32}P marked cell methods. *J. of Physiol.* **116**, 59 (1952). — BENDA, L., A. LOCKER u. E. RISSEL: Zellstoffwechsel und Entzündung (I. Mitt.). Stoffwechseleränderungen in der Leber nach Allylformiatvergiftung. *Z. exper. Med.* **117**, 519 (1951). — BRADLEY, St. E.: Variations in hepatic blood flow in man during health and disease. *New Engl. J. Med.* **240**, 456 (1949). — BRAUER, R. W., and R. L. PESOTTI: Mechanismen of the extraction of Bromsulphalein from the blood plasma by the liver. *Federat. Proc.* **7**, 207 (1948). — BRAUER, R. W., R. L. PESOTTI and N. J. NICOSIA: Hepatic uptake and biliary excretion of bromsulphalein in the dog. *Amer. J. Physiol.* **162**, 565 (1950). — BRAUN, G., A. MEX u. F. A. PEZOLD: Klinische und experimentelle Studien über den „Bromsulphaleintest“. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **200**, 520 (1953). — BULMER, E.: The bromsulphalein test of liver function. A clinical study of sixty-six cases. *Quart. J. Med.* **20**, 101 (1927). — CANTAROW, A., and H. L. STEWART: Alteration in Serum Bilirubin and Bromsulphalein Retention in Relation to Morphological Changes in the Liver and Bile Passages in Cats with Total Biliary Stasis. *Amer. J. Path.* **11**, 561 (1935). — CAROLI, J., et Y. TANASOGLU: Le temps d'apparition de la brome-sulfonephthaléine dans la bile. Nouveau test pur le diagnostic des icteres incomplets par rétention et les blocages anictériques de la voie principale. *Semaine Hop.* **1953**, 591. — CANTAROW, A., and C. W. WIRTS: The effect of dog's bile, certain bile acids and india ink on bilirubinemia and on the excretion of bromsulphalein. *Amer. J. Digest. Dis.* **10**, 261 (1943). — CANTAROW, A., C. W. WIRTS, W. J. SNAPE and L. L. MILLER: Excretion of Bilirubin and Bromsulphalein in bile. *Amer. J. Physiol.* **154**, 211 (1948). — COHN, R., R. LEVINE and D. STREICHER: The rate of removal of ingravenously injected bromsulphalein by the liver and extrahepatic tissues of the dog. *Amer. J. Physiol.* **150**, 299 (1947). — EPPINGER, H.: Die Permeabilitätspathologie. Wien: Springer 1949. — Die Leberkrankheiten. Wien: Springer 1937. — FLECKENSTEIN, A.: Beitrag zum Mechanismus der experimentellen serösen Entzündung durch Allylformiat. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **203**, 151 (1944). — GIGES, B., W. C. MORSE, W. S. SHARON and J. WYNN: The recovery of bromsulphalein following intravenous and oral administration of the dye. *Gastroenterology* **24**, 23 (1953). — GOODMAN, R. D., and G. R. KINGSLEY: Bromsulphalein-Clearance-Test. *J. Amer. Med. Assoc.* **153**, 462 (1953). — HERLITZ, C. W.: A contribution to the knowledge of the function of the liver and the reticuloendothelial system, particularly in infectious diseases of children. *Acta paediat. (Stockh.)* (suppl. 5) **12**, 1 (1931). — v. JANČSÓ, N.: Die Untersuchungen der Funktion des RES mit Durchströmungsversuchen. *Z. exper. med.* **64**, 256 (1928). — KLEIN, R. I., and S. A.

LEVINSON: The removal of bromsulfalein from the blood stream by the reticulo-endothelial system. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **31**, 179 (1953). — KREBS, J., and R. W. BRAUER: Uptake of bromsulfalein by the liver of the rat. II. Studies with radioactive bromsulfalein. *Federat. Proc.* **1**, No. 8, 310 (1949). — LORBER, S. H., and H. SHAY: Enterohepatic circulation of bromsulfalein. I. Studies on man with special reference to clinical BSP-test. *Gastroenterology* **20**, 262 (1952). — MASON, M. F., G. HAWLEY and A. SMITH: Application of the saturation principle to the estimation of functional hepatic mass in normal dog. *Amer. J. Physiol.* **152**, 42 (1948). — MENDELOFF, A. I.: Fluorescence of intravenously administered Rose Bengal appears only in hepatic polygonal cells. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **70**, 556 (1949). — MENDELOFF, A. I., P. KRAMER, F. J. INGELFINGER and S. E. BRADLEY: Studies with Bromsulfalein. II. Factors altering its disappearance from the blood after a single intravenous injection. *Gastroenterology* **13**, 222 (1949). — MILLS, M. A., and C. A. DRAGSTEDT: Bromsulfalein dye retention test as a measure of functional capacity of reticulo-endothelial system. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **34**, 228 (1936). — v. MÖLLENDORFF, W.: Zur Morphologie der vitalen Granulafärbung. *Arch. mikrosk. Anat.* **90**, (Abt. I) 463 (1918). — Die Bedeutung von sauren Kolloiden und Lipoiden für die vitale Farbstoffbindung in den Zellen. *Arch. mikrosk. Anat.* **90** (Abt. I) 503 (1918). — Die Ausscheidung von sauren Farben durch die Leber. *Z. allg. Physiol.* **17**, 125 (1916). — MOSES, C., F. H. CRITCHFIELD and T. B. THOMAS: The importance of the rate of dye removal in the bromsulfalein test of liver function. *J. Labor. a. Clin. Med.* **33**, 448 (1948). — MYERS, J. C.: The hepatic blood flow and splanchnic oxygen consumption of man — their estimation from urea production or bromsulphalein excretion during catheterization of the hepatic veins. *J. Clin. Invest.* **26**, 1130 (1947). — PFUHL, W.: Über die funktionellen Beziehungen zwischen den Leberzellen und den Kupfferschen Sternzellen. *Anat. Anz.* **86**, 273 (1938). — ROSENTHAL, S. M.: The liberation of adsorbed substances from proteins. A function of the bile salts. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **25**, 449 (1925). — The phenoltetrachlorphthalein test for hepatic function: Recent studies with the authors method. *J. Amer. Med. Assoc.* **83**, 1049 (1924). — ROSENTHAL, S. M., and E. C. WHITE: Clinical application of the bromsulfalein test for hepatic function. *J. Amer. Med. Assoc.* **84**, 1112 (1925). — Studies in hepatic function. VI. A. The pharmacological behavior of certain phthalein dyes. B. The value of selected phthalein compounds in the estimation of hepatic function. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **24**, 265 (1925). — ROSENTHAL, S. M., and R. D. LILLIE: Functional and histologic studies of the effect of fat ingestion on the normal and damaged liver. *Amer. J. Physiol.* **97**, 131 (1941). — SCHELLONG, F.: Funktionsprüfung der Leber und des retikuloendothelialen Systems mit Farbstoffen. *Med. Klin.* **1926/II**, 1711. — SCHULEMANN, W.: Die Problematik des RES und seiner Funktion. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **157**, 75 (1940). — SIEGMUND, H.: Speicherung durch Reticuloendothelien, celluläre Reaktion und Immunität. *Klin. Wschr.* **1922**, 2566. — SNELL, A. M., C. H. GREENE and L. G. ROWNTREE: Diseases of liver: comparative study of certain tests for hepatic function in experimental obstructive Jaundice. *Arch. Int. Med.* **36**, 273 (1925). — v. VICTOR, J., J. R. VAN BUREN and H. P. SMITH: Studies on vital staining. IV. India ink and brilliant vital red; importance of studying liver excretion in the study of blockade of the reticulo-endothelial system. *J. of exper. Med.* **51**, 531 (1930). — WIRTS, C. W.: The clinical and laboratory use of bromsulfalein. *Gastroenterology* **16**, 125 (1949).

Dr. M. KESSEL, Dr. P. KÖRTGE u. Professor Dr. F. A. PEZOLD,
Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin (West).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Über zwei chromaffine Zelltypen im Nebennierenmark und ihre Beziehung zum Vorkommen von Adrenalin und Arterenol.

Von

ALFRED BÄNDER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. April 1954.)

VON BACHMANN, WARAFF, LIEBEGOTT, KAMEDA und KURKIEWICZ wurden helle und dunkle Zellen im Nebennierenmark beschrieben. Diese Autoren nahmen an, daß die Unterschiede der Struktur mit Funktionsunterschieden bei der Adrenalinsynthese zusammenhängen. HOLTZ, HOLTZ u. SCHÜMANN, EULER, WEST sowie BÜLBRING u. BURN wiesen in neuerer Zeit außer Adrenalin auch Arterenol im Nebennierenmark des Menschen und verschiedener Tiere nach. HOLTZ u. SCHÜMANN und WEST konnten durch weitere Untersuchungen einen artspezifischen Unterschied im Vorkommen dieser beiden Hormone nachweisen. Sie fanden Arterenol und Adrenalin im Nebennierenmark von Katze, Hund, Mensch, Rind und Schwein, im Nebennierenmark von Meerschweinchen und Kaninchen aber nur Adrenalin. Bei einer Untersuchung der Zellveränderungen innersekretorischer Drüsen im 24 Stundenrhythmus beobachteten wir im Nebennierenmark von Mäusen auch die hellen und dunklen Zellen. Auf Grund dieser Befunde hatten wir die Ansicht geäußert, daß es sich bei den hellen und dunklen Zellen vielleicht um zwei Zelltypen handelt, die in einer Beziehung zum Vorkommen von Adrenalin und Arterenol stehen. Wir haben untersucht, ob die beiden Zellarten im Nebennierenmark verschiedener Tiere gleichmäßig vorkommen und haben gefunden, daß im Mark derjenigen Nebennieren, welche nur Adrenalin enthalten, nur eine Zellart vorhanden ist. Nebennieren, welche Adrenalin und Arterenol enthalten, weisen beide Zellarten auf.

A. Methoden.

1. *Verfahren zur histologischen Untersuchung.* Die Nebennieren von 68 Mäusen, 15 Ratten, 6 Kaninchen, 13 Meerschweinchen, 34 Katzen und 3 Hunden wurden untersucht. Das lebendfrische Material wurde 24 Std in ORTH'schem Gemisch und dann 48 Std in MÜLLER'scher Flüssigkeit fixiert. Nach dieser Fixierung wurden die Präparate 24 Std in fließendem Wasser gewässert. Sie wurden dann nach der von

uns entwickelten Methode mit wasserfreiem Pyridin entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Schnittdicke betrug 4–6 μ . Folgende Färbemethoden wurden angewandt:

1. Die ALTMANNsche Granulafärbung.
2. Die Original-Mallory-Färbung.
3. Die Mallory-Färbung wie unter 2, aber mit veränderten Färbezeiten: Säurefuchsin 45 min, Phosphormolybdänsäure 6 min und 6 min im Mallory-Gemisch.
4. Färbung nur im Mallory-Gemisch für 6–10 min (Mallory-Gemisch: Anilinblau 0,5 g, Orange G 2,0 g, Oxalsäure 2,0 g und dest. Wasser ad 100 cm³). Dieses Gemisch wird aufgeköcht und filtriert.
5. Färbung für 2 Std in 10%igem Säurefuchsin, sofortiges Übertragen zur Differenzierung in eine Lösung von 1% Methylgrün in 70%igem Alkohol für 1 min.
6. Färbung mit GIEMSA-Stammlösung: Die Präparate wurden für 24 Std in unverdünnte GIEMSA-Lösung, darauf 1 min oder auch länger in dest. Wasser gelegt. Danach wurde sie in wasserfreiem Aceton (Trocknung des Acetons über CaCl₂) entwässert bis keine Farbwolken mehr abgingen. Entwässerungsdauer etwa 10 sec. Einschluß der Präparate über Carbolxylol in Balsam. Die Behandlung mit Wasser war für den Ausfall der Färbung wichtig. Das alkohollösliche GIEMSA-Farbgemisch wurde durch das Wasser auf den Proteinstrukturen ausgefällt. Das Aceton bewirkte dann die Differenzierung.

7. Gefärbte und ungefärbte Schnitte wurden im Dunkelfeld untersucht.

2. *Bestimmung von Adrenalin und Arterenol.* Zur Bestimmung des Gehaltes der Nebennieren an Adrenalin und Arterenol wurden Extrakte nach dem Verfahren von FROWEIN hergestellt. Die Extrakte wurden durch ihre Wirkung auf den Blutdruck dekapitierter Katzen im Vergleich mit Adrenalin, Arterenol und Gemischen von beiden Substanzen nach dem Verfahren von HOLTZ u. Mitarb. ausgewertet. Die Katzen wurden mit 70 mg Chloralose/kg narkotisiert. Die Arteriae carotides com. und vertebrales wurde unterbunden, und nach Laminektomie des Atlas wurde das Gehirn zerstört. 0,1 und 0,2 cm³ der Nebennierenextrakte wurden i.v. gespritzt. Nachdem die Nebennierenextrakte auf ihre Blutdruckwirksamkeit geprüft und mit bekannten Mengen von Adrenalin und Arterenol verglichen waren, wurden den Katzen 7 mg Yohimbin/kg i.v. injiziert. Danach wurden die gleichen Mengen Extrakt bzw. Adrenalin, Arterenol und Gemisch nochmal injiziert.

B. Ergebnisse.

1. *Histologische Untersuchungen.* Nach Färbung der Schnitte von Nebennieren der Maus mit Hämatoxylin-Eosin sind in den hellen Zellen grobere Granulationen erkennbar. Die dunklen Zellen besitzen ein mehr homogenes Plasma. Bei den Versuchen, die Granula der hellen Zellen mit der ALTMANNschen Granulafärbung darzustellen, ergab sich ein wesentlicher Unterschied in der Färbbarkeit der beiden Zellarten. Die Granula der hellen Zellen hielten das Säurefuchsin nicht fest, sondern tauschten es bei der Differenzierung mit der Pikrinsäure gegen diese aus und erschienen gelb. Die dunklen Zellen färbten sich mit Fuchsin. Wir bezeichnen daher im folgenden die hellen Zellen als pikrinophile (P-Zellen) und die dunklen Zellen als fuchsinophile (F-Zellen). Die beiden Zellarten ließen sich auch durch mehrere andere Färbeverfahren unterscheiden. Durch die Original-Mallory-Färbung wurden die F-Zellen blau-violett und die P-Zellen gelb-

grün gefärbt. In Abb. 1 ist ein Mikrophotogramm wiedergegeben. Wurden die Färbezeiten, wie in der Methodik angegeben, verlängert, so erschienen die F-Zellen rot-violett und die P-Zellen gelb (siehe Färbeverfahren Nr. 3). Wurde nur im Mallory-Farbgemisch (siehe Methodik Nr. 4) gefärbt, so färbten sich die F-Zellen grün und die P-Zellen gelb. Eine weitere sehr kontrastreiche Färbung ergab die Behandlung mit 10 % igem Säure-Fuchsin und nachfolgende Differenzierung mit Methylgrün (siehe Methodik Nr. 5). Die F-Zellen erschienen in einem leuchtenden Rot und die P-Zellen in einem kräftigen Grün. Schließlich fanden wir in dem

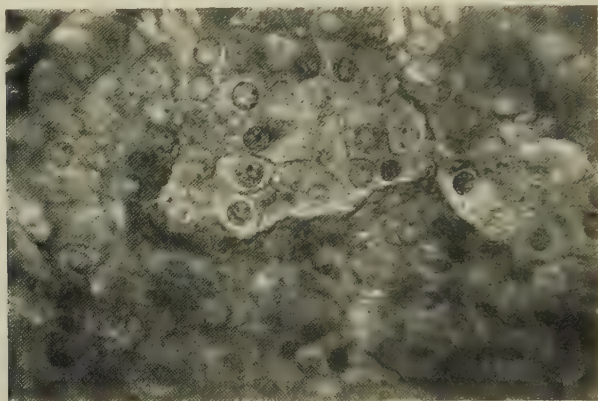


Abb. 1. Nebennierenmark der Maus. Die P-Zellen sind in der oberen Hälfte des Bildes als hellere Zellen erkennbar. Ihre Zellgrenzen sind gut sichtbar, die Kerne sind groß und hell. Färbung nach Verfahren Nr. 3 (siehe S. 141), Vergrößerung 500fach.

GIEMSA-Farbgemisch eine ebenfalls ausgezeichnete Differenzierungsmethode für diese beiden Zellarten (siehe Methodik Nr. 6). Bei diesem Verfahren färbten sich die F-Zellen blau-violett und die P-Zellen leuchtend grün.

Auch im Dunkelfeld ließen sich diese beiden Zellen sehr gut unterscheiden. Auf Grund der größeren Granulationen in den P-Zellen leuchten diese auf, während die F-Zellen dunkel blieben (Abb. 2).

Außer diesen färberischen Unterschieden zeigten die beiden Zellarten noch weitere Besonderheiten. Die Zellgrenzen der P-Zellen waren immer gut zu sehen, während die der F-Zellen verwaschen erschienen (siehe Abb. 1). Die Kerne der P-Zellen ließen sich immer gut hervorheben, die Kerne der F-Zellen jedoch nicht (siehe Abb. 1).

Im Nebennierenmark von Katzen und Hunden waren mit allen Verfahren, die mit Erfolg zur Untersuchung der Nebennieren der Maus angewandt worden waren, ebenfalls beide Zelltypen nachzuweisen. Wie in den Nebennieren der Maus waren die P-Zellen zu Inseln zusammengeagert. Während im Nebennierenmark der Maus nur große P-Zellen

gefunden wurden, waren die P-Zellen im Nebennierenmark von Katze und Hund von ungleicher Größe. Neben großen P-Zellen mit aufgelockertem Protoplasma kamen hier auch kleine mit dichtem Protoplasma vor. Auch unter den F-Zellen dieser Tiere waren kleine neben großen zu finden.

Die Zusammensetzung des Nebennierenmarks aus P- und F-Zellen war bei den Tieren, deren Nebennieren beide Zellarten enthielten, verschieden. Der Anteil der P-Zellen wurde planimetrisch bestimmt. Die Ausmessung von je 26 Schnitten der Nebennieren von 5 Katzen ergab

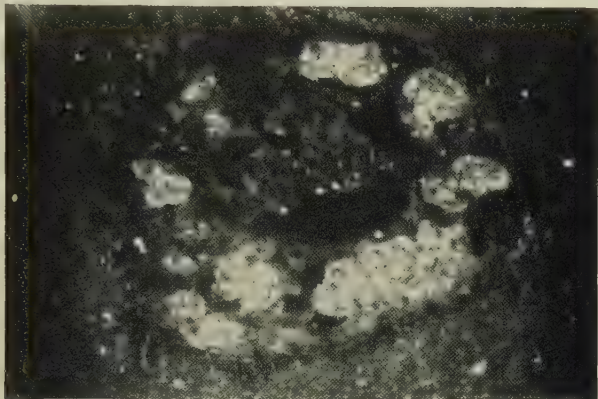


Abb. 2. Nebenniere der Maus. Dunkelfeldaufnahme des gefärbten Schnittes. Die zu Inseln gruppierten P-Zellen leuchten auf. Vergrößerung 200fach.

einen mittleren Flächenanteil von $29 \pm 2,2\%$ für die P-Zellen. Bei der Maus ergab die Ausmessung von je 18 Schnitten der Nebennieren von 11 Tieren einen mittleren Flächenanteil für die P-Zellen von $50 \pm 1,3\%$.

Im Nebennierenmark von Kaninchen, Meerschweichen und Ratte waren nur P-Zellen zu finden. Bei der Dunkelfeldbeobachtung erschienen alle Markzellen gleichmäßig hell (siehe Abb. 3). Die Zellen und Zellgruppen, die auf dieser Abbildung im Mark schwach aufleuchten, sind entweder Ganglienzellen oder versprengte Rindenzellen. Die vollkommen dunklen Felder auf dieser Abbildung stellen Venensinus dar.

Diese färberische Differenzierung gelang bei 6 verschiedenen Färbeverfahren. Vorbedingung für diese Unterschiede ist die Fixierung in MÜLLER-Formol; hierbei ist die Chromierung von ausschlaggebender Bedeutung. Bei anderen Fixierungen, die wir noch vornahmen (Formol, Bouin, Allen), erhält man keine färberischen Unterschiede, sondern nur hell und dunkel gefärbte Zellen. Bei der ZENKERSchen Fixierung (Zusammensetzung: HgCl_2 , Bichromat, Essigsäure) erhält man ebenfalls eine Differenzierung wie bei der MÜLLER-Fixierung, aber mit wesentlich schlechterem Ergebnis.

Wir hatten uns noch die Frage vorgelegt, ob das verschiedene färberische Verhalten auf der Gegenwart von Adrenalin bzw. Arterenol beruhe, oder ob ein verschiedener kolloidchemischer Zustand der Zellen für die Differenzierung verantwortlich zu machen sei. Zu diesem Zwecke injizierten wir in lebensfrisches Leber-, Muskel- und Speicheldrüsengewebe jeweils Adrenalin oder Arterenol in Konzentrationen von 1 : 1000, und fixierten und verarbeiteten die Präparate wie oben beschrieben. Dabei konnten wir nie einen färberischen Unterschied nachweisen. Bei der Fixierung mit MÜLLER-Formol wurden das Adrenalin bzw. Arterenol

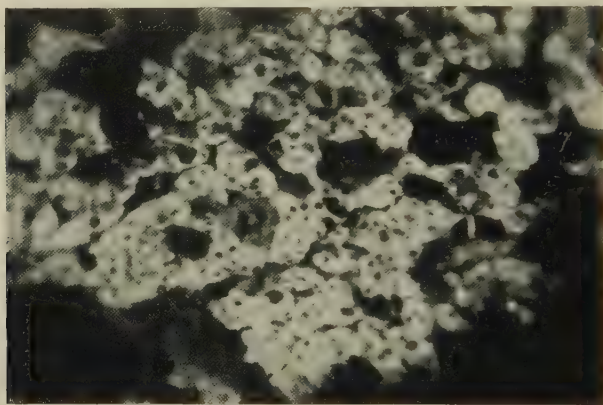


Abb. 3. Nebennierenmark des Kaninchens. Dunkelfeldaufnahme. Im Mark findet man nur P-Zellen, die aufleuchten. Die schwarzen Felder sind Venensinus und die schwächer leuchtenden Gruppen sind Ganglienzellen (links von der Mitte im Bild) oder sogenannte versprengte Rindenzellen. Vergr. 200fach.

durch das Bichromat zu Chinonen oxydiert, während das Bichromat zu niederen Oxydationsstufen reduziert wurde. Diese niederen Oxydationsstufen des Chroms gehen mit den Kolloiden der Zelle wasserunlösliche Verbindungen ein, welche die Gelbfärbung der Zellen bewirken. Da wir annehmen, daß der kolloidchemische Aufbau der Zellen verschieden ist, müssen auch die chromierten Kolloide von verschiedener Natur sein. An diesen verschiedenen chromierten Kolloiden werden dann später die Mehrfachfärbungen durchgeführt, und wir erhalten durch verschiedene Affinitäten zu den einzelnen Farbstoffen die Differenzierungen.

2. *Gehalt der Nebennieren an Adrenalin und Arterenol.* In den Extrakten aus den Nebennieren von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen war eine blutdrucksteigernde Substanz enthalten, deren Wirkung durch Yohimbin umgekehrt wurde. Extraktmengen, die vor der Anwendung von Yohimbin den Blutdruck um 40—60 mm Hg erhöhten, wirkten nach der Injektion von Yohimbin nie blutdrucksteigernd (siehe Abb. 4). Demnach war in diesen Extrakten wahrscheinlich nur Adrenalin vorhanden.

Wenn Arterenol darin enthalten war, so war seine Konzentration sicher kleiner als 5% der Adrenalin-konzentration.

Mengen der Extrakte aus Nebennieren von Mäusen und Katzen, welche den Blutdruck der dekapitierten Katze um 20 mm Hg

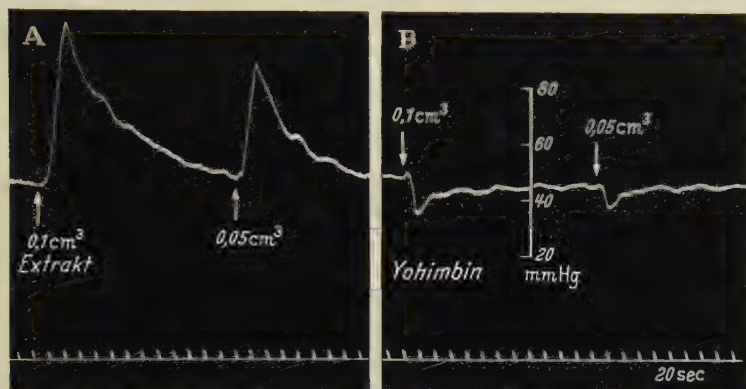


Abb. 4. Wirkung von 0,1 und 0,05 cm³ Extrakt aus Nebennieren von Ratten auf den Blutdruck der dekapitierten Katze. A vor und B 10 min nach Injektion von 7 mg/kg Yohimbin.

steigerten, wirkten auch nach der Injektion von 7 mg Yohimbin/kg noch blutdrucksteigernd (siehe Abb. 5). Die Wirkung des Nebennierenextraktes auf den Blutdruck nach Injektion von Yohimbin glich der eines Gemisches von Adrenalin und Arterenol: nach einer Blutdrucksenkung folgte ein Anstieg über den Ausgangswert.

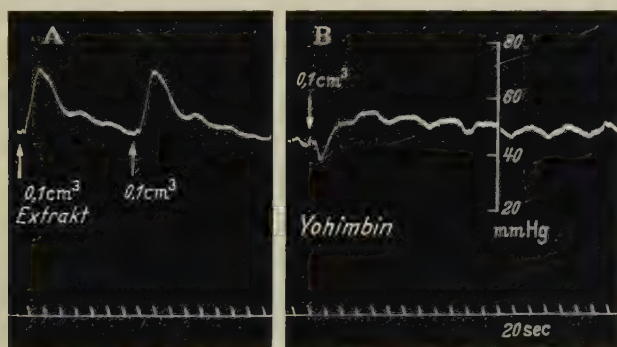


Abb. 5. Wirkung von 0,1 cm³ Extrakt aus Nebennieren von Mäusen auf den Blutdruck der dekapitierten Katze. A vor und B 10 min nach Injektion von 7 mg/kg Yohimbin.

C. Besprechung.

Im Nebennierenmark von Mäusen, Hunden und Katzen konnten wir durch verschiedene Färbeverfahren zwei Zellarten nachweisen, während bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten nur eine vorhanden war.

Die eine Zellart zeigte ein starkes fuchsinophiles Verhalten. Wir haben sie daher in dieser Arbeit als F-Zellen bezeichnet. Die andere Zellart zeichnete sich durch ein besonderes pikrinophiles Verhalten aus (P-Zellen). Beide Zellarten traten bei Hund und Katze in zwei verschiedenen Aktivitätsformen auf. So sahen wir große F- und P-Zellen mit großem hellen Kern im Aktivitätszustand, im Gegensatz zu kleinen F- und P-Zellen mit kleinem, dunkelgefärbten Kern. An der Struktur dieser beiden Zellarten konnten wir bei den Mäusen durch Untersuchung des 24stündigen Tagesrhythmus noch eine weitere Beobachtung machen. Die kleinen dunklen F-Zellen fanden wir immer beim Stoffwechselminimum um 9—11 Uhr in den Monaten Juli und August, während beim Stoffwechselmaximum um 24 Uhr neben den kleinen F-Zellen nun auch noch große mit ebenfalls fuchsinophilem Protoplasma vorhanden waren.

Setzt man zu diesen Befunden das Vorkommen von Adrenalin und Arterenol im Nebennierenmark in Beziehung, so kann man folgende Übereinstimmung feststellen. Bei Mäusen, Hunden und Katzen, die beide Stoffe im Nebennierenmark enthalten, fanden wir auch stets die beiden Zellarten (F- und P-Zellen), während in den Nebennieren von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen, bei denen nur Adrenalin im Mark vorkommt, auch nur eine Zellart (P-Zellen) gefunden wurde.

Diese Übereinstimmung des Vorkommens von Adrenalin und einer Zellart im Nebennierenmark auf der einen Seite, und des Vorkommens von Adrenalin, Arterenol und zwei Zellarten auf der anderen Seite würde einen starken Hinweis dafür geben, daß das Adrenalin in den P-Zellen gebildet wird, während das Arterenol aus den F-Zellen stammen müßte. Einen sicheren Beweis dafür, daß das Arterenol aus den F-Zellen stammt, können wir nicht führen, da bis jetzt noch keine Tierart bekannt ist, deren Nebennierenmark nur aus F-Zellen aufgebaut ist, oder bei der nur Arterenol vorkommt. Unsere Vermutung wird noch durch folgende Beobachtungen gestützt. EULER, SCHULER u. HEINRICH, HOLTZ u. SCHÜMMANN haben den Adrenalin- und Arterenolgehalt verschiedener Nebennieren bestimmt. Sie fanden bei den Katzen den Arterenolanteil zu 70—80% und den Adrenalinanteil zu 20—30%. Ein ähnliches Verhältnis fanden wir bei der planimetrischen Auswertung der einzelnen P- und F-Zellgruppen im Katzennebennierenmark. Der Flächenanteil betrug für die P-Zellen $29 + 2,2\%$ und für die F-Zellen 71%. Diese Zahlen würden mit dem Verhältnis von Adrenalin zu Arterenol gut übereinstimmen. Dabei nehmen wir allerdings an, daß die Produktion in den beiden Zelltypen gleich ist, was natürlich nicht der Fall zu sein braucht.

Im Nebennierenmark von Mäusen fand SCHÜMMANN mehr Adrenalin als Arterenol, nämlich 3 Teile Adrenalin auf 1 Teil Arterenol. Bei der planimetrischen Auswertung der Nebennierenschnitte konnten wir aber nur einen P-Zellenanteil von 50% errechnen. Berücksichtigt man, daß die

P-Zellen im Nebennierenmark der Maus im gleichen Aktivitätszustand waren, während sich die F-Zellen am Tage im Ruhezustand befanden, so ist diese Diskrepanz vielleicht verständlich. Sie ist jedenfalls kein Argument gegen die Annahme, daß Adrenalin von den P-Zellen und Arterenol von den F-Zellen gebildet wird.

Zusammenfassung.

Durch verschiedene Färbeverfahren wurden im Nebennierenmark von Mäusen, Katzen und Hunden zwei chromaffine Zellarten dargestellt und charakterisiert. Im Nebennierenmark von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten konnte nur eine der beiden Zellarten nachgewiesen werden.

Da im Nebennierenmark von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten nur Adrenalin vorkommt, in dem der Mäuse, Katzen und Hunde aber neben dem Adrenalin noch Arterenol vorhanden ist, wird angenommen, daß Adrenalin und Arterenol von verschiedenen Zellen des Nebennierenmarks gebildet werden.

Literatur.

BACHMANN, R.: *Erg. Anat.* **33**, 31 (1941). — BÄNDER, A.: *Z. exper. Med.* **115**, 229—250 (1950). — *Z. Mikrosk.* **60**, 502—505 (1952). — BÜLBRING, E., u. J. H. BURN: *Brit. J. Pharmacol.* **4**, 202 (1949). — v. EULER, U. S.: *Erg. Physiol.* **46**, 216 (1950). — *Brit. Med. J.* **1951**, 105. — FROWEIN, B.: *Biochem. Z.* **134**, 558 (1923). — HOLTZ, P., K. CRENDER u. G. KRONEBERG: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **204**, 228 (1947). — HOLTZ, P., u. H. J. SCHÜMANN: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **210**, 1 (1950). — *Arch. internat. Pharmacodynamie* **83**, 417 (1950). — HOLTZ, P., u. K. CRENDER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **200**, 365 (1942). — KAMEDA, P.: *Kaibo Z. Tokyo* **8**, 1012 (1936). — KURKIEWICZ, TH.: *Cr. assoc. Anat. Varsovie* **26**, 352 (1931). — LIEBEGOTT, G.: *Beitr. pathol. Anat.* **109**, 93 (1944). — WALRAFF, J.: *Z. Zellforsch.* **34**, 262 (1942). — WEST, G. B.: *J. of Pharmacy a. Pharmacol.* **2**, 732 (1951). — *Brit. J. Pharmacol.* **6**, 665, 289 (1951). — *J. of Physiol.* **115**, 21 P (1951). — SCHULER, W., u. P. HEINRICH: *Helvet. physiol. Acta* **7**, 515 (1949). — SCHÜMANN, H. J.: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **87**, 212 (1951).

Dr. ALFRED BÄNDER, Marburg/Lahn, Pharm. Inst. d. Univ.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Zur Differenzierung der Rezeptoren für den BEZOLD-JARISCH-Reflex.

Von

MARTIN KRAMER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. März 1954.)

In Untersuchungen von W. HEUBNER und D. VIESSMANN wurde über eine reflektorische Atemhemmung durch p-Chloräthanolamin berichtet, die nicht durch die Pressorezeptoren des Carotissinus ausgelöst wurde und durch Vagotomie aufhebbar war. Dieser Befund ist deswegen bemerkenswert, weil man diesen Atemreflex sonst in Verbindung mit einer gleichzeitig auftretenden Bradykardie und Blutdrucksenkung kennt. Das p-Chlorphenyläthanolamin gehört aber chemisch und pharmakologisch zur Reihe der sympathomimetischen Amine und bewirkt eine Blutdrucksteigerung. Die Symptomen-Trias: Atemstillstand, Bradykardie und Blutdrucksenkung, erstmalig 1867 von A. v. BEZOLD und L. HIRT als Veratrinwirkung beschrieben, von W. CRAMER und vornehmlich von A. JARISCH und H. RICHTER genauer analysiert, ist heute als BEZOLD-JARISCH-Reflex allgemein bekannt. Da nun das p-Chloräthanolamin nur den Atemstillstand auslöst, war es interessant zu erfahren, ob durch diese Substanz die gleichen Rezeptoren erregt werden, die beim BEZOLD-JARISCH-Reflex die Atmung stillstellen. In diesem Falle der Identität der Rezeptoren wären Zweifel an einer *gekoppelten* Funktion und physiologischen Bedeutung der Atem- und Kreislaufreflexe berechtigt.

Von den Veratrumalkaloiden ist bekannt, daß sie auch eine Reihe anderer sensibler Rezeptoren erregen, die nicht zu denen des BEZOLD-JARISCH-Reflexes gehören. So berichtet E. WITZLEB über eine Verstärkung der chemo- und pressoreceptorischen Aktionspotentiale im Carotissinusnerven durch Veratrin.

Die ersten genaueren Untersuchungen über die Lokalisation der Rezeptoren für den durch Veratrumalkaloide ausgelösten Atemreflex stammen von G. S. DAVES aus dem Jahre 1947. In Versuchen an Katzen erbrachte er den experimentellen Beweis für die Lokalisation der Rezeptoren im Ausbreitungsgebiet der A. pulmonalis. Nach Freilegung des Herzens bei erhaltener Spontanatmung (nach einer Modifikation der Methode von DRINKER), injizierte er Veratridin in den li. und re. Ventrikel oder in die A. pulmonalis. Dabei stand die Atmung nach Injektion in die re. Herzkammer oder in die A. pulmonalis still, während sie nach Injektion in den li. Ventrikel unbeeinflusst blieb. Blutdrucksenkung und Bradykardie waren jedoch bei jeder Applikationsart in gleicher Weise aufgetreten. Damit war erwiesen, daß der Atemstillstand durch andere Rezeptoren ausgelöst wurde als Bradykardie und

Blutdrucksenkung. Die Kreislaufreaktionen beobachtete DAVES, wenn er kleinste Veratridosen in einen der beiden Äste der A. coronaria sinistra injizierte. Die Injektion in die re. Coronararterie hatte keinen Effekt. D. M. AVIADO jr., R. G. PONTIUS u. C. F. SCHMIDT (1949) katheterisierten die A. pulmonalis beim Hund und lokalisierten die Atemreflexrezeptoren in deren Ausbreitungsgebiet. Sie konnten ebenfalls Herz- und Atemwirkungen des Veratridins voneinander differenzieren. O. KRAYER u. G. H. ACHESON nehmen einen weiteren Angriffspunkt im Zentralnervensystem an, weil nach hohen Veratridosen auch bei Durchtrennung des Vagus in der Halsregion eine Atemhemmung auftritt.

Außer den Veratrumalkaloiden sind andere Substanzen bekannt, die ebenfalls einen reflektorischen Atemstillstand verursachen. G. S. DAVES nannte 1947 das Nicotin, das ebenfalls Rezeptoren in der Lunge erregt. Später untersuchte er mit der gleichen Methodik zusammen mit J. C. MOTT aromatische Guanidine, ferner mit F. N. FASTIER Isothioharnstoffderivate, die ebenfalls einen reflektorischen Atemstillstand hervorrufen, dessen Rezeptoren im Verzweigungsgebiet der A. pulmonalis liegen. D. M. AVIADO, R. G. PONTIUS u. T. H. LI beschrieben das gleiche von einer großen Zahl verschiedener Antihistamine, ebenso O. ORIAS, J. L. GILBERT u. CH. McC. BROOKS. Die letztgenannten Autoren lokalisierten jedoch die Rezeptoren für den Atemreflex nicht näher. H. A. WALKER, S. WILSON, C. FARRAR, R. J. LANGSTON u. A. P. RICHARDSON teilten von der 3-Hydroxy-2-phenyl-Cinchoninsäure und zahlreichen ihrer Derivate die gleiche Eigenschaft mit, ferner H. A. WALKER, P. S. JONES u. A. P. RICHARDSON von Pyridinderivaten. Alle genannten Substanzen rufen gleichzeitig mit dem Atemstillstand eine Blutdrucksenkung und Bradykardie hervor. Für die Guanidin- und Isothioharnstoffderivate wiesen DAVES u. Mitarb. die gleichen Angriffspunkte für die Kreislaufwirkung wie beim Veratridin im li. Ventrikel und außerdem einen Receptor in der Lunge nach. Die Reflexe wurden auch durch Vagotomie aufgehoben. Daraus könnte geschlossen werden, daß die in der Lunge und im li. Herzen für den Atmungs- und Kreislaufreflex festgestellten Rezeptoren sehr ähnliche Empfindlichkeit aufweisen und einheitlich funktionieren. Für die von AVIADO u. Mitarb. beschriebenen Antihistamine gilt dies jedoch wahrscheinlich nicht, da die Blutdrucksenkung durch Vagotomie nicht zu beseitigen ist. Beiden von den anderen Autoren genannten Verbindungen wurden eingehendere Untersuchungen über die Lokalisation der Rezeptoren nicht angestellt.

F. EICHHOLTZ, A. FLECKENSTEIN, R. MUSCHAWECK u. F. BOHLINGER fanden, daß die Kreislaufreflexe des Veratrins durch anticholinergisch wirksame Substanzen wie Atropin, Trasentin, Parpanit u. a. ausgeschaltet werden können. DAVES; K. G. MOE, D. L. BASSET u. O. KRAYER; AVIADO u. Mitarb. gelang es nicht, den Atemstillstand durch Atropin zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Angriffspunkt einiger Substanzen untersucht, die einen reflektorischen Atemstillstand auslösen, sich aber hinsichtlich ihres sonstigen pharmakologischen Verhaltens voneinander unterscheiden. Ferner wurde versucht, den durch diese Substanzen ausgelösten Atemstillstand pharmakologisch zu beeinflussen. Es handelte sich 1. um das von HEUBNER und VIESSMANN benutzte p-Chlorphenyläthanolamin¹, ein blutdrucksteigerndes Sympathicomi-

¹ Herrn Dr. E. ROESCH von der Firma Merck bin ich zu Dank verpflichtet für die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellten reinen Veratrumalkaloide Veratridin und Cevadin, ferner der Firma Riedel de Haen für das p-Chlorphenyläthanolamin und der Chemischen Fabrik Tempelhof für den Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanol.

meticum, 2. um den Phenylallylessigsäureester des Diäthylamino-äthanol¹, eine blutdrucksenkende gering anticholinergisch wirksame Substanz, und 3. um das Veratrinsulfat und die reinen Veratrumalkaloide Veratridin und Cevadin¹ (siehe Fußnote S. 149).

Methodik.

Katzen beiderlei Geschlechts wurden mit 1,25 g/kg Urethan i.p. narkotisiert, die Atmung mittels einer an eine Trachealkanüle angeschlossenen MAREYSchen Kapsel und der Carotisdruck mit einem Membranmanometer registriert. In der

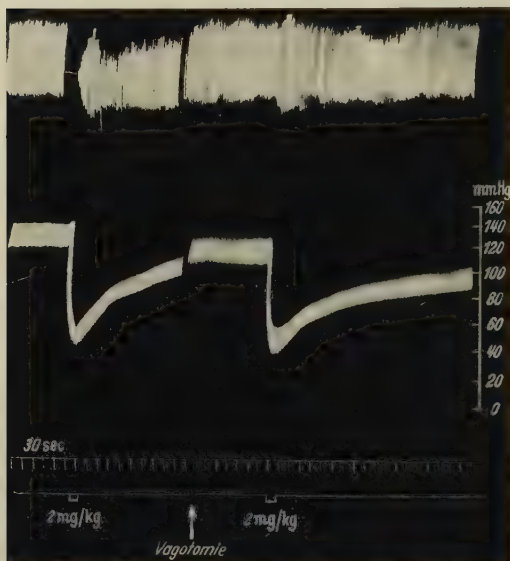


Abb. 1. Atem- und Blutdruckwirkung des Phenylallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolesters vor und nach Vagotomie. Obere Kurve: Atmung. Untere Kurve: Blutdruck.

ersten Versuchsreihe zur Lokalisation des Receptors wurden die zur Reflexauslösung verwandten Substanzen durch die intakte Brustwand in den re. oder li. Ventrikel intracardial injiziert, wobei als Kontrolle die Farbe des aspirierten Blutes diente. In einer anderen Versuchsreihe wurde in Modifikation der Methode von DAVES das Herz in der Weise freigelegt, daß die Tiere nach der Operation spontan atmeten. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen. Nach Einbinden einer Trachealkanüle wurde der m. pectoralis stumpf abpräpariert und die 5. Rippe freigelegt, dann das Tier künstlich beatmet. Jetzt erfolgte die Resektion der Rippe vom Sternastrand bis etwa 1 cm über die Knorpel-Knochengrenze

lateralwärts unter Schonung der Intercostalgefäße. In einigen Fällen wurde außerdem die 6. Rippe in gleicher Weise reseziert. Nach stumpfer Ablösung der an der resezierten Rippe inserierenden Muskulatur von der parietalen Pleura wurde die zwischen Intercostalmuskulatur und Pleura am Sternastrand verlaufende A. und V. mamma interna unterbunden und durchtrennt. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Pleura-raumes, dann des Perikards unter Schonung der Gefäße mit einem Kreuzschnitt, schließlich das Annähen der Schnittländer des Perikards an die Ränder der geschaffenen Thoraxöffnung mit luftdicht abschließenden Knopf- oder fortlaufenden Nähten. Bei genügend großer Perikardöffnung war das Herz jetzt in der künstlichen Thoraxöffnung so weitgehend freigelegt, daß man den re. und li. Ventrikel, die Vorhöfe, die Aorta und die A. pulmonalis gut erreichen konnte. Von der V. jugularis externa aus wurde ein Katheter in den re. Ventrikel und von da aus in die A. pulmonalis dirigiert. Seine Lage konnte durch Palpation gut kontrolliert werden. Danach wurde die Atempumpe abgestellt, worauf nach kurzer Zeit die Spontanatmung eintrat. Nach Abschluß des Versuches wurden Herz und Lungen seziiert,

um festzustellen, in welcher Höhe der Katheter in der Pulmonalis lag und ob er bereits über die Teilungsstelle hinaus in die re. Lunge gelangt war. Bei zu weitem Hinaufschieben des Katheters kam es gelegentlich zur Ausbildung eines Infarktes.

*Kreislaufwirkungen des Phenyldiallylessigsäureesters
des Diäthylaminoäthanolis und des p-Chlorphenyläthanolamins.*

Beim p-Chlorphenyläthanolamin stellte sich gelegentlich vor der normalerweise erfolgenden Blutdrucksteigerung eine Blutdrucksenkung ein. Dieser Effekt war durch Vagotomie nicht zu beseitigen, trat aber nach

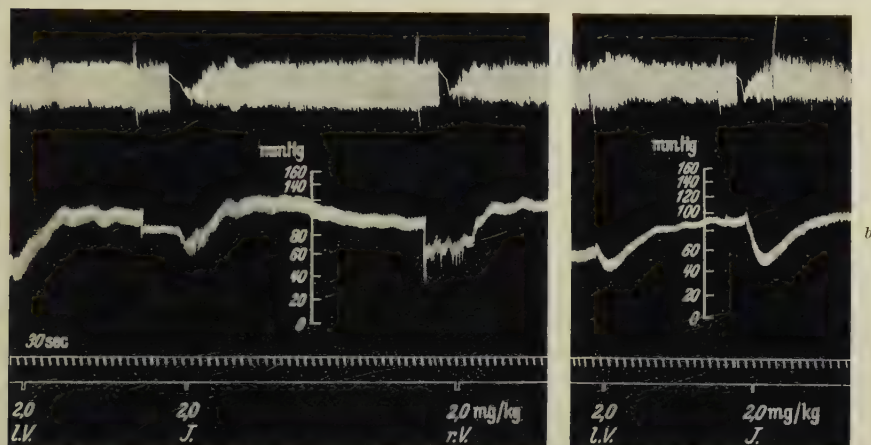


Abb. 2. *a* Wirkung von p-Chlorphenyläthanolamin und *b* dem Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanoleser auf Atmung und Blutdruck bei Injektion in die li. oder re. Ventrikel oder in die V. jugularis.

Zeichenerklärung: *CHP* p-Chlorphenyläthanolamin, *PhD* Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanoleser, *l. V.* linker Ventrikel, *r. V.* rechter Ventrikel, *J. V.* jugularis. *P. A.* pulmonalis.

Denervierung oder Exstirpation des Carotissinus nicht mehr ein, so daß man schließen kann, daß er nicht durch Erregung von Herzrezeptoren, sondern des Carotissinus zustande kommt.

Der Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanolis bewirkte in den angewandten Dosen eine starke Blutdrucksenkung und geringere Bradykardie, die jedoch auch nach Durchschneidung des Halsvagus unverändert vorhanden waren, während der Atemstillstand nicht mehr auftrat. Abb. 1 zeigt die Wirkung von 2 mg/kg vor und nach Vagusdurchtrennung, wobei die völlige Kongruenz der Blutdruckkurven bemerkenswert ist.

Versuche zur Lokalisation der Rezeptoren.

An 6 Katzen wurde zunächst eine der beiden Verbindungen oder Veratrinsulfat in den rechten oder linken Ventrikel, die V. jugularis oder femoralis gespritzt. Dabei zeigte sich, daß bei keiner Substanz der Atemstillstand nach Injektion in den linken Ventrikel auftrat (Abb. 2). Damit

war zunächst gesichert, daß auch für den Phenylallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanolis sowie für das p-Chloräthanolamin die Rezeptoren im rechten Ventrikel oder in der A. pulmonalis oder deren Ausbreitungsgebiet liegen mußten.

Um diese Frage weiter zu klären, wurde an insgesamt 16 Katzen in der oben beschriebenen Weise bei freigelegtem Herzen die Spontanatmung registriert und die A. Pulmonalis katheterisiert. Lag der Receptor im rechten Ventrikel, so mußte der Reflex bei Injektion in die Pulmonalis ausbleiben, lag er in der Pulmonalis, oder ihren Verzweigungen, so mußte

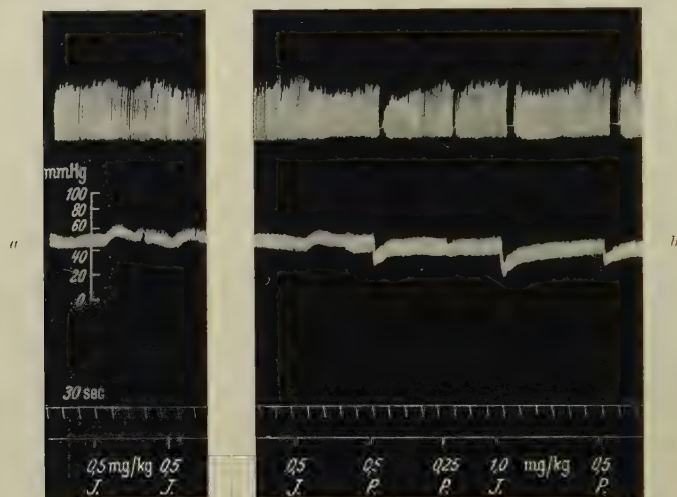


Abb. 3. *a* Wirkung verschiedener Dosen von p-Chlorphenyläthanolamin und *b* Diäthylaminoäthanoles ter auf Atmung und Blutdruck bei Injektion in die A. Pulmonalis und V. jugularis.

es möglich sein, ihn bei direkter Injektion mittels des Katheters in die Pulmonalis mit kleineren Dosen auszulösen, als bei Injektion in eine Vene oder den rechten Ventrikel. In dieser Versuchsreihe wurden an Stelle des Veratrinsulfats die reinen Veratrumalkaloide Veratridin und Cevadin vergleichsweise untersucht, da nach den Untersuchungen von O. KRAYER die in den Gemischen enthaltenen Alkaloide verschiedene Wirkungen haben, was auch E. ROESCH kürzlich bestätigte. Es zeigte sich, daß für alle Substanzen der Receptor in der Pulmonalis liegen muß, da die Bedingungen für diese Hypothese in jedem Falle erfüllt wurden. Der Atemstillstand konnte bei Injektion in die Pulmonalis mit kleineren Dosen der geprüften Substanzen ausgelöst werden und zwar genügte beim Phenylallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanolis ein Fünftel und beim p-Chlorphenyläthanolamin ein Viertel der bei Injektion in die Jugularis notwendigen Dosis (Abb. 3). Eine Injektion auch großer Dosen in den linken Ventrikel war ohne Effekt.

Pharmakologische Beeinflussung des Atemreflexes.

a) *Durch Atropin.* Der Einfluß von Atropin auf den reflektorischen Atemstillstand nach p-Chlorphenyläthanolamin, dem Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanolis und Veratrinsulfat wurde an 6 Katzen untersucht. Dabei zeigte sich, daß nur der durch Veratrin ausgelöste Atemstillstand durch Atropin abgeschwächt wurde. Nähere Angaben sind aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. *Einfluß von Atropin auf den Atemreflex nach Veratrin.*

Tier	Atropindosis	Wirkung auf den Atemreflex
1	1 mg/kg	Reflex aufgehoben
2	1 mg/kg	Reflex abgeschwächt
3	2 mg/kg	Reflex unbeeinflusst
4	2 mg/kg	Reflex gering abgeschwächt
5	3 mg/kg	Reflex abgeschwächt
6	4 mg/kg	Reflex abgeschwächt

Die Abb. 4 zeigt den Fall 1, bei dem der Atemreflex des Veratrins durch 1 mg/kg Atropin aufgehoben wird. Die sonst einem Atemstillstand folgende Steigerung der Atemfrequenz kommt auch hier gut zum Ausdruck.

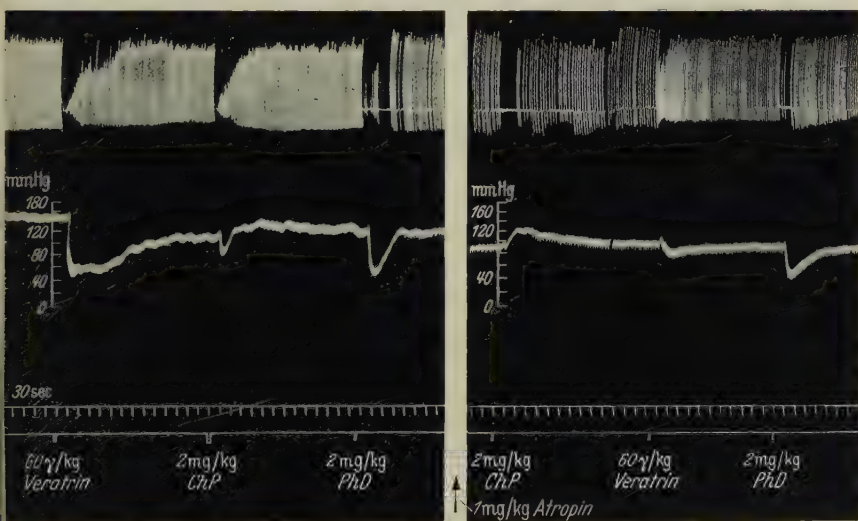


Abb. 4. Einfluß von Atropin auf Atem- und Kreislaufwirkungen von Veratrin, p-Chlorphenyläthanolamin und Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthylester.

b) *Durch Parpanit (1-Phenylcyclopenten-1-Carbonsäurediäthyl-Aminoäthylester-HCl).* Einige Versuche mit Parpanit wurden deswegen vorgenommen, weil A. FLECKENSTEIN und Mitarbeiter gefunden hatten,

daß diese Substanz am besten den durch Veratrin ausgelösten BEZOLD-JARISCH-Effekt verhindert, wobei sie jedoch nur die Kreislaufwirkungen berücksichtigten. An Tieren zeigte sich kein Einfluß auf die Atmungswirkung der drei Substanzen, weswegen die Versuche nicht fortgesetzt wurden. Entgegen den Beobachtungen A. FLECKENSTEINS konnten auch die Kreislaufwirkungen des Veratrins bei diesen drei Tieren mit 2—5 mg/kg Parpanit nicht wesentlich beeinflußt werden.

c) Durch Pendiomid [*N, N, N', N'-3-pentamethyl-N, N'-diäthyl-3-aza-pentyl-(1,5)-diammoniumdibromid*]. Der Einfluß von Pendiomid

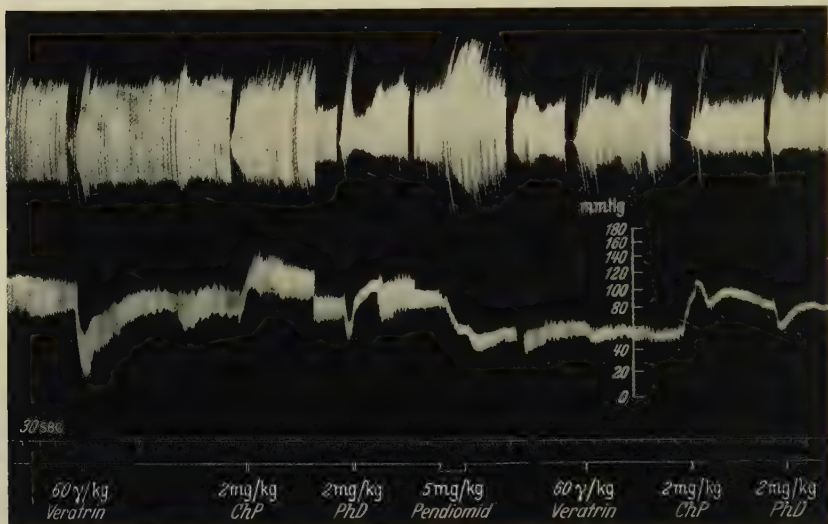


Abb. 5. Einfluß von Pendiomid auf Atem- und Blutdruckwirkungen von Veratrin, p-Chlorphenyläthanolamin und Phenylallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolester.

wurde an 4 Katzen untersucht. Die Kreislaufwirkung des Veratrins ließ sich in allen Fällen durch Vorbehandlung mit 1—5 mg/kg Pendiomid aufheben. In zwei Fällen trat sogar eine Blutdrucksteigerung ein. Der Atemstillstand hingegen wurde verlängert. Beim p-Chlorphenyläthanolamin blieb die Blutdrucksteigerung unbeeinflußt oder wurde verstärkt der Atemstillstand wurde ebenfalls verlängert und zwar noch ausgesprochener als beim Veratrin. Die Atem- und Kreislaufwirkung des Phenylallylessigsäureesters vom Diäthylaminoäthanol blieb unbeeinflußt (Abb. 5).

Dikussion.

Das p-Chlorphenyläthanolamin und der Phenylallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanol lösen einen Atemstillstand aus, ohne die im Herzen gelegenen Rezeptoren des BEZOLD-JARISCH-Reflexes zu erregen. Dies konnte einfach dadurch bewiesen werden, daß nach Durchtrennung

des Vagus in der Halsregion der Atemstillstand aufgehoben war, die Kreislaufwirkung jedoch unverändert blieb. Die Untersuchung über die Lage der Rezeptoren für den Atemreflex ergab für alle untersuchten Substanzen eine Lokalisation im Verzweigungsgebiet der A. pulmonalis. Unter der Voraussetzung, daß von allen Verbindungen, also auch von denen, die keinen BEZOLD-JARISCH-Effekt bewirken, die gleichen Rezeptoren erregt werden, muß man annehmen, daß der reflektorische Atemstillstand ein selbständiger Reflex ist und keine *gekoppelte* Funktion mit den Kreislaufreflexen des BEZOLD-JARISCH-Effektes besitzt. Da aus der gleichen Lokalisation nicht unbedingt auf eine Identität der durch die verschiedenen Substanzen erregten Rezeptoren geschlossen werden kann, wurde versucht, den Atemreflex pharmakologisch zu beeinflussen. Dabei auftretende Unterschiede würden möglicherweise eine genauere Charakterisierung der Rezeptoren erlauben. Für das Atropin ergab sich, daß entgegen den Beobachtungen von K. G. MOE, D. L. BASSET und O. KRAYER; G. S. DAVES und D. M. AVIADO u. Mitarbeiter der durch Veratrin ausgelöste Atemstillstand abgeschwächt und in einem Falle sogar aufgehoben werden konnte. Dieser Effekt war zwar nicht in allen Fällen reproduzierbar und nicht dosisabhängig, ein Unterschied gegenüber dem p-Chlorphenyläthanolamin und dem Phenylallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanol, deren Wirkung auf die Atmung unbeeinflusst blieb, ist jedoch deutlich. Nach K. BUCHER liegt der Angriffspunkt der Wirkung des Atropins auf die Atmung zentral, da es inspirationshemmende Mechanismen in der kapitalen Hälfte der Pons zu dämpfen vermag. Eine Wirkung auf den afferenten Vagus lehnt er ab. Es wäre vorteilhaft, aus diesen Unterschieden zu schließen, daß verschiedene Rezeptoren erregt werden, da auch die Möglichkeit besteht, daß die gleichen Rezeptoren durch p-Chlorphenyläthanolamin und den Phenylallylessigsäure-Diäthylaminoäthano-lester stärker als durch Veratrin erregt und deswegen die durch sie hervorgerufenen Atemhemmungsimpulse durch Atropin nicht abgeschwächt werden.

Bei den Versuchen mit Pendiomid wurden nur die Kreislaufwirkungen des Veratrins aufgehoben, was wahrscheinlich auf der bekannten Blockade der im efferenten Reflexbogen liegenden vegetativen Ganglien beruht. Die Unbeeinflussbarkeit der Blutdruckwirkungen der beiden anderen Verbindungen ist wiederum ein Beweis für einen anderen Angriffspunkt. Die nach Veratrin und vorwiegend nach p-Chlorphenyläthanolamin unter Pendiomid auftretende Verlängerung des Atemstillstandes könnte durch eine Blockierung von Ganglien bedingt sein, über die gegenregulatorische Impulse verlaufen. Dies erklärt aber nicht, weswegen der durch den Phenylallylessigsäure-Diäthylaminoäthano-lester hervorgerufene Atemstillstand nicht verändert wird. Dieses verschiedene Verhalten wäre leichter durch die Annahme verschiedener Rezeptoren erklärbar.

Im allgemeinen herrscht bisher die Ansicht vor, daß es sich um gleiche Rezeptoren handelt und dieser Reflex unspezifisch ist, was seine physiologische Bedeutung vergrößern würde. K. BUCHER nimmt an, daß sie mit den Dehnungsrezeptoren identisch sind, deren Erregung ebenfalls einen Atemstillstand verursacht. Der experimentelle Beweis dafür steht noch aus. Nach H. F. ZIPF und H. MIESTERECZ werden die Aktionsimpulse der aus den Gefäßen kommenden B_1 -Fasern eher und mehr verstärkt als die der A- und A'-Fasern aus den Dehnungsrezeptoren. Dieser Befund spricht dafür, daß eine Erregung der B_1 -Rezeptoren und nicht der Dehnungsrezeptoren den Atemstillstand nach Veratrin auslöst.

Durch die vorliegenden Untersuchungen ist gesichert, daß ein Atemstillstand ohne das Zustandekommen eines BEZOLD-JARISCH-Reflexes ausgelöst werden kann. Die Rezeptoren für diesen isoliert ausgelösten Atemreflex liegen wie die Veratrin-Rezeptoren im Ausbreitungsgebiet der A. pulmonalis. Die Frage, ob es verschiedene Rezeptoren für diesen Atemreflex gibt oder ob sie identisch sind, muß vorläufig offen bleiben. Im letzteren Falle sprächen die Befunde gegen eine gemeinsame physiologische Bedeutung des Atem- und Kreislaufreflexes und ließen es richtiger erscheinen, den BEZOLD-JARISCH-Effekt als einen reinen Kreislaufreflex anzusehen.

Zusammenfassung.

p-Chlorphenyläthanolamin und der Phenyldiallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanol, die einen reflektorischen Atemstillstand ohne Auslösung der Kreislaufreflexe von BEZOLD-JARISCH hervorzurufen vermögen, wurden im Vergleich mit Veratrumalkaloiden an 35 Katzen untersucht. Die Rezeptoren für den Atemreflex wurden durch Katheterisieren der A. pulmonalis in deren Ausbreitungsgebiet lokalisiert. Durch Atropin, Parpanit und Pendiomid wurde eine pharmakologische Beeinflussung der Atemhemmung versucht.

Zur Deutung der Versuchsergebnisse muß man entweder das Vorhandensein verschiedener Rezeptoren für den Atemreflex in der Lunge annehmen oder seine physiologische Zuordnung zu den Kreislaufreflexen des BEZOLD-JARISCH-Effektes ablehnen.

Literatur.

AVIADO, D. M. jr., R. G. PONTIUS and C. F. SCHMIDT: The reflex respiratory and circulatory actions of Veratridine on pulmonary, cardiac and carotid receptors. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **97**, 420 (1949). — AVIADO, D. M. jr., R. G. PONTIUS and T. H. LI: The mechanism of apnea following intravenous injection of various Antihistaminic compounds; its relation to their chemical structure. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **99**, 425 (1950). — BEZOLD, A. v., u. L. HIRT: *Unters. Physiol. Lab. Würzburg* **1**, 73 (1867). — zit. nach CRAMER, W., *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **7**, 63 (1915). — BUCHER, K.: Reflektorische Beeinflussbarkeit der Lungenatmung. Wien: Springer 1952. — CRAMER, W.: On the action of Veratrum viride.

J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **7**, 63 (1915). — DAVES, G. S.: Studies on Veratrum-alkaloids, VII. Receptor areas in the Coronary arteries and elsewhere as revealed by the use of Veratridine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 325 (1947). — DAVES, G. S., and J. C. MOTT: Circulatory and respiratory reflexes caused by aromatic guanidines. Brit. J. Pharmacol. **5**, 65 (1950). — DAVES, G. S., and F. N. FASTIER: Reflex actions of some Isothiourea derivatives on circulation and respiration. Brit. J. Pharmacol. **5**, 323 (1950). — EICHHOLTZ, F., A. FLECKENSTEIN u. R. MUSCHAWECK: Über die Beeinflussung des BEZOLD-JARISCH-Reflexes durch intravenös verabreichte Lokalanaesthetica und Antihistaminkörper. Klin. Wschr. **1949**, **71**. — FLECKENSTEIN, A., R. MUSCHAWECK u. F. BOHLINGER: Weitere Untersuchungen über die pharmakologische Ausschaltung des BEZOLD-JARISCH-Reflexes. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **211**, 132 (1950). — HEUBNER, W., u. D. VIESSMANN: Reflektorische Atemhemmung durch p-Chlorphenyläthanolamin. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 40 (1953). — JARISCH, A., u. H. RICHTER: Die Kreislaufwirkung des Veratrins. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **193**, 347 (1939). — Die afferenten Bahnen des Veratrineffektes in den Herznerven. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **193**, 355 (1939). — KRAYER, O., and G. H. ACHESON: Physiol. Rew. **26**, 383 (1946). — zit. nach G. S. DAVES, J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 325 (1947). — MOE, G. K., D. L. BASSETT and O. KRAYER: J. Pharmacology Exper. Ther. **80**, 272 (1944). — zit. nach G. S. DAVES, J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 325 (1947). — ORIAS, O., J. L. GILBERT and CH. McC. BROOKS: Cardio-respiratory effects following intravenous administration of some Antihistaminic drugs. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 492 (1949). — ROESCH, E.: Über die Wirkung von Cevadin, Veratridin und einen Veratrumviride-Extrakt auf Blutdruck und Atmung von wachen Hunden. Verh. dtsch. Pharmacol. Ges. Bonn 1953. — WALKER, H. A., S. WILSON, C. FARRAR, R. J. LANGSTON and A. P. RICHARDSON: The cardiovascular and respiratory effects of 3-Hydroxy-2-phenyl-Cinchonic acid. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 71 (1951). — WALKER, H. A., S. WILSON, C. FARRAR and A. P. RICHARDSON: The reflex respiratory and circulatory actions of some Cinchoninic acid derivatives and a number of unrelated compounds. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **104**, 211 (1952). — WALKER, H. A., P. S. JONES and A. P. RICHARDSON: The reflex respiratory and circulatory activity of 1-Pyridindene derivatives. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 301 (1953). — WITZLEB, E.: Über die Wirkung des Veratrins auf die chemo- und pressoreceptorischen Aktionspotentiale im Carotissinusknoten. Pflügers Arch. **256**, 234 (1952). — ZIFF, H. F., und H. MIESTERECK: Über die intravenöse Wirkung verschiedener Lokalanaesthetica auf die Lungensensibilität. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 472 (1953).

Dr. MARTIN KRAMER, Berlin-Dahlem, Pharm. Inst. d. Fr. Univ., Thielallee 69/73.

Aus der II. med. Klinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL).

pH-Messungen im lebenden Gewebe mit besonderer Berücksichtigung des Pankreas.

Von

LEONHARD HELD und HELMUT MASKE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 3. Mai 1954.)

In früheren Arbeiten wurden Untersuchungen über das Verhalten des Zinks in den LANGERHANSSchen Inseln des Pankreas bei verschiedenen physiologischen Funktionszuständen durchgeführt. Ausgehend von den dabei gewonnenen Beobachtungen wurden Vorstellungen über die Bedeutung des Inselzinks für die gesteuerte Insulinabgabe entwickelt⁴⁻⁶.

Die physiologischen Insulindepots sind Insulin und verhältnismäßig viel Zink enthaltende Granula in den Inselzellen. Die Voraussetzung für eine Abgabe des Hormons an das Blut ist die Überführung des schwer löslichen Insulinzink-Komplexes in eine lösliche Form. Auf welchem Wege das geschieht, ist bisher unbekannt.

Das physikalisch chemische Verhalten von derartigen organischen Metallkomplexen hängt sehr stark von der Wasserstoffionenkonzentration ab. Sowohl die Dissoziationskonstante der Komplexverbindung wie auch chemische Reaktionen der Komplexe oder ihrer Teile variieren weitgehend mit dem pH. Für die Entwicklung weiterer Vorstellungen über das physiologische Verhalten der Insulindepots ist infolgedessen die Kenntnis der örtlichen Wasserstoffionenkonzentration von besonderer Bedeutung.

Es wäre nicht ganz richtig von dem pH des Pankreas zu sprechen, da die Wasserstoffionenkonzentration in einem strukturell differenzierten Gewebe starke örtliche Schwankungen zeigen kann.

Innerhalb einzelner Zellen werden von DANIELLI pH-Unterschiede von 1,0 und mehr zwischen dem flüssigen Medium des Cytoplasmas und den Proteinoberflächen angegeben und ein DONNAN-Gleichgewicht angenommen¹. Selbst an der Oberfläche einzelner Eiweißmoleküle finden sich Wasserstoffionenkonzentrationsunterschiede bedingt durch ihre verschiedenen ionisierbaren Gruppen.

Da die colorimetrischen und infolgedessen in mikroskopischen Bereichen anwendbaren Methoden der pH-Messung im Gewebe starken Fehlern unterliegen (Protein- und Salzfehler) haben wir auf ihre Anwendung verzichtet.

Genauere Bestimmungen lassen sich nur durch elektrische Potentialmessungen durchführen. Allerdings haben die pH-Messungen mit den verschiedensten Elektroden den Nachteil, daß sie nicht auf den Bereich ein-

zelter Zellen reduziert werden können, sondern durchschnittliche Werte für mehr oder weniger große Zellbezirke ergeben. Aber auch die Kenntnis eines durchschnittlichen p_H ist für die obengenannten Vorstellungen interessant, zumal wenn das p_H im Pankreas wesentlich von dem anderer Organe abweicht.

Methoden und Material.

Unter den verschiedensten Elektroden standen zunächst die Antimonelektrode, die Platinelektrode, die Gold-Iridium-Elektrode und die Glaselektrode zur Wahl.

Die Antimon-Nadelelektrode wurde nicht verwendet, da nach eigenen Versuchen der Salzfehler beim Arbeiten mit verschiedenen Puffern von gleichem p_H zu groß war. Die Platinwasserstoff-Elektrode kam nicht in Frage, da ihre Einstellzeit für biologische Untersuchungen zu lang ist und weil das Platinmohr beim Einstechen in Gewebe zu leicht von der Nadelelektrode abgestreift wird.

Die im Handel befindlichen Mikroglaselektroden, die sicher die genauesten Werte ergeben würden, erfordern eine Einstichtiefe von 10 mm, die am Pankreas kleiner Tiere nicht gegeben ist. Außerdem war der Eigenwiderstand dieser Glaselektroden für das zur Verfügung stehende Meßinstrument zu groß.

Die Gold-Iridium-Hohlnadel in Verbindung mit Wasserstoff als Meßgas nach v. LANZ und MALYOTH erschien für den vorgesehenen Zweck am meisten geeignet.

Die Beschreibung der *Iridium-Wasserstoff-Elektrode* und ihrer Anwendung muß den Arbeiten von v. LANZ und MALYOTH entnommen werden^{2,3}. Bei der Vorbereitung der Nadel wurde insofern von den dort angegebenen Vorschriften abgewichen, als die mechanisch mit Hilfe eines Motors in Schwingung versetzte kathodisch geschaltete goldene Hohlnadel bei 15—20 mA (anstatt 0,3 mA) in einem Zeitraum von 1,5 Std (anstatt 20 Std) galvanisch mit einer 3%igen Lösung von Iridiumtetrachlorid behandelt wurde. Als Anode diente ein etwa 0,5 mm starker Platindraht. Auf diese Weise wurde regelmäßig ein fester und auch bei mikroskopischer Betrachtung ganz gleichmäßiger Iridiumüberzug erzielt. Als *Bezugselektrode* wurde eine sogenannte Kalomeltauchelektrode nach WULFF und KORDATZKI verwendet und mit Hilfe eines Mikroskopstativs 2—3 cm von der Meßstelle entfernt auf das Gewebe aufgesetzt.

Als *Meßinstrument* diente das Röhrenvoltmeter („Ultrajonograph“) nach KORDATZKI und WULFF, das gegenüber den Kompensationsinstrumenten den Vorteil eines geringeren Meßstromverbrauchs hat.

Als *Meßgas* wurde reiner jeweils frisch im KIPPSchen Apparat erzeugter und mehrfach gewaschener Wasserstoff verwendet.

Die *Eichung* erfolgte nach vorhergehender Wasserstoffsättigung der Elektrode in Standardpuffern p_H 7,00 und 9,10 bei 35° C. Die Eichkurven waren bei derselben Elektrode reproduzierbar, schwankten aber zwischen verschiedenen Galvanisierungen etwas. Die Einstellung der endgültigen Meßwerte erfolgte bei Versuchen in einem Modellgewebe innerhalb von längstens 4 min und waren dann über die beobachtete Zeit von über 20 min hinaus völlig konstant.

Die *Versuche* wurden an etwa 2 kg schweren mischrassigen Kaninchen durchgeführt, die 12—18 Std vorher gehungert hatten. Als Narkoticum wurde eine 5%ige Evipanlösung i.v. gespritzt. Bis zur Reflexlosigkeit wurden durchschnittlich 50 mg/kg benötigt.

Nach der Laparatomie wurde das Pankreas hervorgezogen und mit der Milz auf einem kleinen Korktischchen so befestigt, daß Blutgefäße weder verletzt noch abgeklemmt wurden. Unter Lupenbeobachtung wurde die Serosa möglichst blutfrei

von der Drüse abgezogen und die inzwischen vorbereitete Elektrode mit Hilfe einer Mikrometerschraube vorsichtig auf das blutfreie Drüsengewebe aufgesetzt, ohne daß die gläserne Schutzhülle einen starken Druck ausübt. Anschließend wurde die Goldiridium-Nadel selbst langsam auf das Gewebe gesenkt bis der Ultrajonograph den ersten Ausschlag zeigt. Innerhalb von 2–4 min war die Einstellung auf konstante Werte im allgemeinen beendet.

Zu den Messungen an der Leber mußte sinngemäß etwas anders verfahren werden. Die GLISSONSche Kapsel konnte wegen der sonst erfolgenden starken Blutung nicht entfernt, sondern mußte durchstochen werden.

An der Muskulatur wurde die Messung nach der Entfernung des Bindegewebes in gleicher Weise durchgeführt.

Die Elektrode wurde zwischen den Einzelmessungen jeweils mit aqua dest. gespült und mit fettfreiem Filtrierpapier sorgfältig trocken getupft. Für jedes Tier wurde eine frisch mit Iridium galvanisierte Elektrode verwendet, da andernfalls die Meßergebnisse durch Adsorption von Gewebseiweiß an der Elektrodenoberfläche ungenau werden.

Weiter zeigte sich bei Vorversuchen, daß die Elektrode absolut ruhig auf dem Gewebe aufliegen muß, wenn eine schnelle und stetige Einstellung der endgültigen Meßwerte erreicht werden soll. Wenn das Gewebe an der Meßstelle nicht vollständig blutfrei ist, werden die Meßresultate durch das Blut-pH deutlich beeinflusst. Auf Beobachtungen über den Einfluß von Narkosetiefe und -dauer und damit zusammenhängender Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere auf das pH der Gewebe vgl. weiter unten (S. 162).

Im allgemeinen wurden nacheinander Pankreas, Leber und Muskulatur an den einzelnen Versuchstieren gemessen. Ausgewertet wurden die Mittel der minütlichen Ablesungswerte vom Punkt der konstanten Einstellung ab.

Dabei wurden einzelne Meßwerte eliminiert, wenn sie offensichtlich durch Veränderungen der äußeren Bedingungen aus dem Rahmen fielen, z. B. durch Bewegungen des Tieres, durch starke Verschlechterung des Kreislaufes u. ä. Faktoren.

Ergebnisse.

1. *pH des Pankreas.* Die Einzelergebnisse wurden in 15 Meßreihen an 11 verschiedenen Tieren gewonnen (vgl. Tab. 1). Zur statistischen Auswertung wurden je 7 vergleichbare Werte von 14 Reihen herangezogen. Die Häufigkeitsverteilung der 98 Einzelwerte ist aus Abb. 1 zu ersehen. Der Mittelwert und dessen dreifache mittlere Abweichung (3σ)* betrug $7,98 \pm 0,38$.

* Die mittlere Abweichung wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\sigma_x = \pm \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (M - x_i)^2}.$$

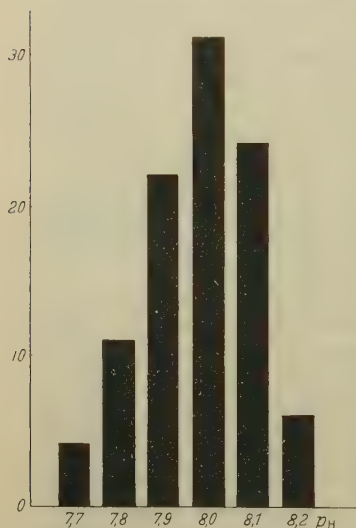


Abb. 1. Häufigkeitsverteilung der pH-Werte im Pankreas. 98 Einzelwerte.

Tabelle 1.

Dat.	Tier	Einstellzeit				Meßergebnisse							Bemerkungen					
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 min	
7. 7.	2,4 kg	7,52	7,55	7,62	7,80	7,92	7,97	7,98	8,02	8,02	8,06	8,08	8,08					nicht aus- gewertet
7. 7.	2,4 kg	7,70	7,70	7,88	7,89	7,89	7,92	7,93	7,98	8,02	8,08	8,06						
10. 7.	2,3 kg	7,82	7,83	7,84	7,90	7,90	7,92	7,95	7,95	7,95	7,94	7,92	7,92	7,88	7,88	7,88	7,88	
10. 7.	2,3 kg	7,62	7,62	7,66	7,68	7,73	7,75	7,71	7,73	7,77	7,77	7,77	7,79	7,79	7,79	7,82	7,85	
10. 7.	2,3 kg	7,65	7,70	7,75	7,80	7,85	7,90	7,97	8,01	8,02	8,03	8,03	7,99	8,00	7,99	8,00	8,00	Coccydiöse
26. 10.	2,0 kg	6,55	7,23	7,43	7,65	7,84	7,95	7,91	7,94	8,02	8,05	8,02						
26. 10.	2,0 kg	7,12	7,31	7,84	7,87	7,76	7,89	7,92	7,88	7,94	7,95	7,90						
27. 10.	2,0 kg	7,02	7,89	8,06	8,24	8,22	8,18	8,12	8,09	8,06	8,09	8,06						
28. 10.	2,0 kg	6,64	7,22	7,44	7,62	7,68	7,86	7,97	8,02	8,12	8,19	8,22	8,26	8,28	8,28	8,27		
2. 11.	2,2 kg	7,20	7,54	7,74	7,80	7,88	7,84	7,84	7,84	7,84	7,86	7,86						
2. 11.	2,0 kg	6,65	7,44	7,77	7,94	7,95	8,18	7,71										
5. 11.	1,9 kg	6,46	7,34	7,66	7,74	7,82	8,05	8,06	8,05	8,03	8,04	8,04						
6. 11.	2,5 kg	6,30	7,30	7,72	7,86	7,95	8,04	8,08	8,08	8,08	8,08	8,08						
6. 11.	2,5 kg	6,66	7,64	7,64	7,74	8,15	8,15	8,13	8,13	8,02	8,02	8,02						
7. 11.	2,0 kg	6,64	7,10	7,40	7,56	7,92	7,99	8,10	8,09	8,07	8,04	8,04						

2. p_H der Muskulatur. Von 11 Meßreihen (Tab. 2) mußten 5 von einer Auswertung ausgeschlossen werden, da 2 Tiere bei Beginn der Messungen ad exitum kamen, und weil 3 Tiere in einem schlechten Allgemeinzustand waren. Bei diesen 5 nicht ausgewerteten Versuchsreihen fällt auf, daß das p_H unter dem der übrigen liegt. Die Ursache für den schlechten Zustand der Tiere liegt in der langen Versuchs- und Narkosedauer. Die Messungen an der Muskulatur wurden jeweils am Schluß durchgeführt. Die statistische Sichtung der verwertbaren Meßreihen ergibt als Mittelwert von 42 Einzelmessungen an 7 Tieren $7,03 \pm 0,38$.

3. p_H der Leber. Ein Überblick über die Meßergebnisse an der Leber zeigt das Vorliegen von zwei verschiedenen Gruppen, von denen die eine (bestehend aus 6 Reihen) ein durchschnittliches p_H von 7,12 und die andere (bestehend aus 4 Reihen) mit 7,81 ein deutlich höheres p_H aufweist (Tab. 3).

Wie bereits in dem methodischen Abschnitt besprochen wurde, waren die Untersuchungsbedingungen an der Leber insofern ungünstiger als an den anderen Organen, als ihre bindegewebige Kapsel vor der Messung nicht entfernt werden konnte, ohne daß es zu Blutungen kam. Es mußte infolgedessen die Leberkapsel von der Elektrode durchstochen werden, ohne daß das Meßergebnis durch zu tiefes Einstechen der Elektrode verfälscht wird. (v. LANZ, SCHADE und NEUKIRCH beobachteten einen Abfall des p_H bei stärkerem Einstechen der Nadelelektrode in das zu messende Medium, der mit einer Verarmung der Elektrode an Wasserstoff erklärt wurde.)

Wir haben bei den Messungen an der Leber aus den angeführten Gründen versucht, die GLISSONSche Kapsel mit der Elektrode gerade zu durchstechen. Es kann sein, daß das nur bei einem Teil dieser Versuche der Fall war und daß es dadurch zu den unterschiedlichen Werten bei der Messung des p_H in der Leber gekommen ist.

Diskussion.

Die praktische Durchführung der p_H -Messung in lebendem Gewebe mit der Goldiridium-Wasserstoffelektrode nach v. LANZ und MALYOTH zeigte deren Brauchbarkeit für diesen Zweck und ganz besonders für Messungen in kleineren Bereichen, wie sie sich bisher mit der Glaselektrode kaum erfassen lassen. Allerdings erfordert die Handhabung der Elektrode wesentlich mehr Vorbereitungen und Umstände und dementsprechend auch mehr Sorgfalt als die der Glaselektrode.

Die Messungen im Pankreas ergaben einheitlich im Verhältnis zum Blut höhere Werte. Die Meßergebnisse im Muskelgewebe lagen nicht so dicht zusammen, insbesondere wurde ein Absinken des Muskel- p_H bei Verschlechterung von Atmung und Kreislauf beobachtet, eine Tatsache, die einige Überlegungen anzuknüpfen erlaubt. Wir sind auf Grund unserer Erfahrungen mit dem viel häufiger untersuchten Blut gewohnt, mit einem

Dat.	Tier	Einstellzeit			Meßergebnisse										Bemerkungen	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 min		
7. 7.	2,4 kg	6,99	6,93	6,72	6,57	6,47	6,53	6,57	6,57						Exitus bei Meßbeginn Exitus während der Einstellzeit	
10. 7.	2,3 kg	6,86	6,88	6,98	7,02	6,98	6,96	6,98	6,98	7,00	6,96	6,98	7,00			
26. 10.	2,0 kg	7,20	7,20	7,24	7,24	7,24	6,80	5,16	5,34	5,34						
26. 10.	2,0 kg	6,58	6,73	6,81	6,83	6,90	6,81	6,84	6,91	6,83	6,89	6,85			Kreisl. u. Atmung schlecht " " " " " " " " " Coccydiöse	
27. 10.	2,0 kg	6,85	6,93	6,94	6,96	6,98	6,99	7,00	7,00	7,00	7,01	7,00				
28. 10.	2,0 kg	6,44	6,44	6,44	6,48	6,52	6,48	6,48	6,47	6,45	6,38	6,38				
2. 11.	2,2 kg	6,08	6,08	6,52	6,35	6,29	6,26	6,08	6,08	6,08	6,10	6,32	6,46	6,43		
2. 11.	2,0 kg		6,45	6,40	6,35	6,32	6,32	6,32	6,35	6,30	6,32	6,32				
5. 11.	1,8 kg	6,50	6,60	6,78	6,84	6,90	6,94	6,97	7,00	7,00	7,00	7,00			Coccydiöse	
6. 11.	2,5 kg	6,87	7,03	7,07	7,09	7,10	7,12	7,16	7,18	7,21	7,22	7,23				
7. 11.	2,0 kg	7,42	7,38	7,34	7,24	7,26	7,24	7,23	7,23	7,21	7,21	7,20	7,20			

Tabelle 3.

Dat.	Tier	Einstellzeit			Meßergebnisse										Bemerkungen	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 min		
7. 7.	2,4 kg	7,30	7,30	7,33	7,36	7,36	7,40	7,36	7,30	7,30	7,30	7,34			nicht ausgewertet	
10. 7.	2,3 kg	7,34	7,40	7,43		7,43		7,50		7,52			7,40	7,46		
26. 10.	2,0 kg	6,82	6,95	7,03	7,13	7,15	7,30	7,26	7,32	7,37	7,39		7,45			
26. 10.	2,0 kg	6,87	6,98	7,10	7,22	7,30	7,22	7,22	7,08	7,04	7,02		7,02			
28. 10.	2,0 kg	6,42	6,50	6,61	6,74	6,88	6,92	7,02	7,07	7,07	7,06		7,06			
2. 11.	2,2 kg	6,77	6,92	7,00	7,03	7,02	7,03	7,00	7,00	7,00	7,00		7,02		Coccydiöse	
5. 11.	1,8 kg	6,82	6,64	6,82	6,90	6,94	6,94	6,94	6,93	6,93	6,94		6,94			
27. 10.	2,0 kg	7,60	7,86	8,03	8,04	8,02	7,96	7,86	7,83	7,80	7,79		7,80			
2. 11.	2,0 kg	7,60	7,84	7,96	7,94	7,94	7,92	7,90	7,79	7,14	6,74		6,46			
6. 11.	2,5 kg	7,00	7,74	7,95	8,06	8,10	8,10	7,99	7,88	7,88	7,88		7,86			
7. 11.	2,0 kg	7,92	7,96	8,05	8,14	8,16	8,16	8,16	8,28	8,28	8,24					

sehr konstanten und durch eine starke Pufferfähigkeit aufrechterhaltenen p_H zurechnen. Das trifft in demselben Maß zumindestens für die Muskulatur nicht zu. Die p_H -Konstanz in diesem Organ ist anscheinend von der Aufrechterhaltung des nur durch eine gute Blutversorgung garantierten normalen Stoffwechsels abhängig, ein Problem, das übertragen auf den Herzmuskel für eine Reihe von klinischen Fragen besonders interessant ist. Auch der große Gedankenkomplex über die Grenze zwischen Reversibilität und Irreversibilität an- bzw. hypoxaemischer Schäden einzelner Organe hängt sicher eng mit deren p_H -Änderungen zusammen. Über das p_H in der Leber erlauben unsere Untersuchungen auf Grund technischer Schwierigkeiten keine definitive Aussage. Es kam uns jedoch in erster Linie darauf an, möglichst genaue Aussagen über das p_H im Pankreas zu machen und zu dem Zweck auch Vergleichswerte von anderen Organen zu erhalten. Zwischen dem p_H des Pankreas und der Muskulatur besteht auch nach Ausschaltung der niedrigeren durch Kreislauf- und Atemverschlechterung bedingten Werte in der Muskulatur eine signifikante Differenz.

Wie in der Einleitung bereits festgestellt wurde, läßt sich mit unserer Methodik die Wasserstoffionenkonzentration nur summarisch in der Gewebsflüssigkeit des untersuchten Organs feststellen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die auf diese Weise ermittelten Werte einen Anhalt für das Milieu geben, in dem sich die uns interessierenden biochemischen Vorgänge abspielen.

Zusammenfassung.

1. In verschiedenen Organen narkotisierter Kaninchen wurden p_H -Messungen mit der Gold-Iridium-Wasserstoffelektrode nach v. LANZ und MALYOTH durchgeführt.

2. Das p_H war im Pankreas mit $7,98 \pm 0,38$ signifikant höher als in der Muskulatur mit $7,03 \pm 0,38$.

3. Verschlechterung von Kreislauf und Atmung hatten ein Absinken des p_H in der Muskulatur zur Folge.

Herrn Professor v. LANZ möchten wir an dieser Stelle für die freundliche Überlassung seiner Elektrode und für seinen Rat danken.

Die Untersuchungen wurden durch die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Literatur.

- ¹ DANIELLI, J. F.: Cell Physiology and Pharmacology, Elsevier Publ. Comp., inc. 1950. — ² LANZ, T. v., u. G. MALYOTH: Pflügers Arch. **222**, 534 (1929). — ³ LANZ, T. v.: Z. wiss. Mikrosk. **48**, 1 (1931). — ⁴ MASKE, H.: Acta neurovegetativa (Wien) **8**, 51 (1953). — ⁵ MASKE, H.: Z. Naturforsch. **8b**, 96 (1953). — ⁶ MASKE, H.: Vortrag neuroveget. Symposion. Florenz 1953 (Acta neurovegetativa, im Druck).

Dr. HELMUT MASKE, München, II. Med. Klinik d. Univ.

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ).

Über die Altersabhängigkeit der tödlichen Strophanthindosis bei der Ratte.

Von
H. NOWY.

(Eingegangen am 7. Mai 1954.)

Die große Resistenz der Ratte gegen Digitalisglykoside ist vielfach untersucht, ihr Mechanismus jedoch noch nicht geklärt worden. Daß die Ursache im Myokard selbst zu suchen ist, wurde von GUNN am isolierten Herzen demonstriert. GENUIT konnte zeigen, daß isolierte Rattenherzen eine 50—100mal höhere Strophanthinkonzentration als Meerschweinchen- und Katzenherzen vertragen und daß auch das Rattenherz etwa 10% der Letaldosis bindet. Als Ursache der verschiedenen Empfindlichkeit wurden Einwirkungen auf den Gewebestoffwechsel erwogen. Der Nachweis für eine solche Annahme ist jedoch nicht erbracht.

Im folgenden wird die Frage untersucht, wie sich die Empfindlichkeit des Rattenherzens im Verlaufe der Entwicklung vom Zeitpunkt der Geburt bis zum fertigen Tier verhält.

Methodik.

Handelsübliches K-Strophanthin (Kombetin Boehringer) wurde den Versuchstieren intraperitoneal injiziert. Bei den jungen Tieren war es notwendig, den Ampulleninhalt mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen. Es wurde höchstens 0,2 cm³ Flüssigkeit verabreicht. Wegen der Fragilität der Gewebe neugeborener Tiere mußte die Einstichstelle nach der Injektion mit einer Klammer verschlossen werden, um ein Auslaufen der Lösung zu verhindern. Eine exakte Bestimmung der Letaldosis ist bei einem so kleinen Versuchstier kaum möglich und im Rahmen der Fragestellung auch nicht wesentlich. Da es sich herausstellte, daß die Empfindlichkeit junger und alter Tiere gegen Strophanthin sehr verschieden ist, begnügten wir uns mit der Feststellung der Größenordnung der tödlichen Dosis. In einem Teil der Versuche wurden die Tiere auf einer angewärmten Paraffinunterlage befestigt und das Elektrokardiogramm registriert.

Ergebnisse.

Die tödliche Dosis liegt für K-Strophanthin bei einmaliger intraperitonealer Injektion bei erwachsenen Ratten bei etwa 20 mg/kg (MAIER). Dieser Wert wurde von LENDLE und OLDENBURG auch bei subcutaner Injektion am nichtnarkotisierten Tier gefunden. Neugeborene bzw. junge Ratten sind gegen Strophanthin viel empfindlicher, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

Versuch 1: 10 neugeborene Tiere aus gleichem Wurf erhalten 1 mg/kg. Am nächsten Tag sind davon 8 Tiere tot, 2 überleben.

Versuch 2: 5 neugeborene Tiere aus gleichem Wurf im Gewicht von 5—6 g erhalten 1 mg/kg K-Strophanthin. 1 Std nach der Injektion sind alle Tiere deutlich cyanotisch, die Atmung ist stark verlangsamt. 1½ Std nach Injektion sind 3 Tiere tot, 1 Tier verendet in der 4. Std, 1 Tier erholt sich wieder.

Versuch 3: 5 neugeborene Tiere im Gewicht von 4—5 g erhalten 2 mg/kg Kombetin. Nach 30 min sind alle 5 Tiere stark cyanotisch verfärbt. Nach 4 Std sind 4 Tiere tot, 1 Tier zeigt nach dieser Zeit noch Schnappatmung und erholt sich wieder bis zum nächsten Tag.

Versuch 4: 10 neugeborene Tiere aus gleichem Wurf erhalten 0,25 bis 2 mg/kg mit folgendem Resultat:

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mg/kg Stroph.	0,25	0,25	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5	1,5	2,0	2,0
Effekt	überleben nach 24 Std				20 Std †	20 Std †	120 min †	20 Std †	20 Std †	20 Std †

Die Tiere 5, 6, 8, 9 und 10 waren 3 Std nach der Injektion noch am Leben und verendeten erst im Verlauf der Nacht.

Versuch 5: 9 3 Tage alte Tiere im Gewicht von 6,8—8 g erhalten 1—6 mg/kg.

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
mg/kg Strophanthin	1	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6
Effekt	überleben nach 24 Std			110 min †	190 min †	65 min †	55 min †	25 min †	45 min †

Die tödliche Dosis für K-Strophanthin beträgt somit für neugeborene Ratten etwa 1 mg/kg, das ist etwa $\frac{1}{20}$ derjenigen erwachsener Ratten. MAIER (s. S. 1) hat auf unsere Veranlassung die Größe der Letaldosis auch bezüglich des weiteren Wachstums untersucht und fand dabei folgende Abhängigkeit vom Tiergewicht:

10—15 g	2,5 mg/kg
15—20 g	3—4 „
(Tiere noch blind)	
25—35 g	5,0 „
45 g	13,0 „
80 g	20,0 „

Die außergewöhnliche Resistenz der Ratte gegen Strophanthin entwickelt sich somit in der Hauptsache erst während des postnatalen Wachs-

tums. Ein besonders steiler Anstieg der Resistenz findet sich bei 30—40 g, wenn die Tiere etwa Mausgröße erreicht und sich die Augen geöffnet haben. Die tödliche Strophanthindosis liegt aber auch bei der neugeborenen Ratte schon etwas höher als z. B. bei erwachsenen Meer-schweinchen, Kaninchen und Katzen. Sie ist etwa gleich groß, wie für Frösche bei subcutaner Verabreichung (HOUGHTON).

Diskussion.

Aus unserer Beobachtung ergeben sich interessante Aspekte bezüglich des Wirkungsmechanismus der Digitalisglykoside. Die Abhängigkeit der tödlichen Dosis K-Strophanthin vom Lebensalter der Ratte fügt sich in den Rahmen der Vielzahl von Beobachtungen, die die Bedeutung gewebespezifischer Faktoren für die Digitaliswirkung aufzeigen. Deutlichster Ausdruck dafür ist die Variation der Empfindlichkeit zwischen verschiedenen Tierarten. Eine solche Variation findet sich aber auch schon innerhalb des gleichen Herzens. Wie STRAUB gezeigt hat, ist schon beim Froschherzen, bei dem infolge Fehlens eines Coronargefäßsystems der Faktor der Blutverteilung wegfällt, das Ventrikelmuskulatur 10mal empfindlicher als die Vorhofmuskulatur. Selbst innerhalb der Kammermuskulatur des Warmblüterherzens scheinen solche Unterschiede zu bestehen (NOWY u. HELMREICH, HELMREICH u. NOWY). Die von HOFFMANN und WIENKE vermutete Abhängigkeit der tödlichen Dosis vom Durchmesser der Herzmuskelfasern und der Schlagfrequenz des Herzens ist in unserem Fall nicht zu finden. Wäre die Letaldosis umgekehrt proportional dem Faserdurchmesser, müßte die tödliche Dosis bei neugeborenen Tieren größer sein, als bei erwachsenen. Auch eine Proportionalität zur Schlagfrequenz besteht nicht. Das Herz erwachsener Ratten schlägt 2—3mal so schnell wie das neugeborener, die Letaldosis ist aber 20mal so hoch.

Aus unserer Beobachtung können wir schließen, vorausgesetzt daß die Bindungsquote des Myokards gleich groß ist, daß Strophanthin ein zur Funktion notwendiges Substrat vergiftet, das beim neugeborenen Tier empfindlicher ist, oder in geringerer Menge gebildet wird als beim erwachsenen Tier. Sie zeigt ferner, daß dieses Substrat, zumindest bei der Ratte, mit dem Wachstum im Zusammenhang steht.

Es ist derzeit noch nicht möglich, eine Korrelation zu einem bestimmten Substrat herzustellen, da keine ausreichenden Daten über die chemische Zusammensetzung bei der Entwicklung des Myokards verfügbar sind.

Eigene vergleichende Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung des Gewebestoffwechsels und des Elektrokardiogramms ergaben zwar deutliche Unterschiede der Reaktionsweise bei jungen und alten Ratten, erklären aber nicht den großen Unterschied der Letaldosis. Hier sei lediglich erwähnt, daß bei neugeborenen Ratten toxische Strophanthinmengen keinen Einfluß auf die Atmung und Glykolyse haben.

JEHL u. WOLLENBERGER machten die gleiche Beobachtung bezüglich der Gewebsatmung bei jungen Meerschweinchen. Auf Grund der Untersuchungen GREINERS scheint eine Beeinflussung der energiereichen Phosphate durch Strophanthinvergiftung als Ursache etwas wahrscheinlicher. Digitalisintoxikation würde danach den Bestand an Adenosintriphosphorsäure reduzieren. Dieser ist im Herzen neugeborener Tiere, analog der Skelettmuskulatur, sicher kleiner. Dadurch läßt sich aber unseres Erachtens nicht die relativ langsame Resistenzzunahme im Laufe des Wachstums erklären, da der definitive Nucleotidbestand des Myokards rascher erreicht werden dürfte.

Auch über die Bindungsbedingungen der Digitalisglykoside an Herzmuskelproteine lassen sich noch keine Aussagen machen.

Zusammenfassung.

Neben Unterschieden der Empfindlichkeit verschiedener Tierspecies und verschiedener Abschnitte des gleichen Herzens finden sich auch Unterschiede im Verlauf der postnatalen Entwicklung.

Neugeborene Ratten sind gegen Strophanthin viel empfindlicher als erwachsene. Bei intraperitonealer Verabreichung beträgt die tödliche Dosis K-Strophanthin für neugeborene Tiere 1 mg/kg, für erwachsene Ratten dagegen etwa 20 mg/kg. Die Unterempfindlichkeit der Ratte gegen Strophanthin entsteht zum größeren Teil erst allmählich im Verlauf des Wachstums.

Literatur.

GENUIT, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **188**, 285 u. 302 (1938). — GREINER, TH.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 178 (1952). — GUNN, J.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **4**, 225 (1913). — HELMREICH, E., u. H. NOWY: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 411 (1951). — HOFFMANN, G., u. H. WIENKE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 225 (1953). — HOUGHTON, E. M.: J. Amer. Med. Assoc. 1898, zit. nach STRAUB, W.: Handb. d. Pharmacol. **2/2**, 1355 (1924). — JEHL, J., and A. WOLLENBERGER: Federat. Proc. **288** (1950). — LENDLE, L., u. D. OLDENBURG: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **211**, 243 (1950). — MATER, H.: Dissertation. München 1953. — NOWY, H., u. E. HELMREICH: Klin. Wschr. **1950**, 686. — STRAUB, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **79**, 19 (1915).

Dr. H. Nowy, München, Med. Poliklinik d. Univ.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft Basel.

Enthemmende Wirkung von Metallen auf die hydrazingehemmte enzymatische Oxydation von Cadaverin.

Von

W. SCHULER und R. MEIER.

(Eingegangen am 21. Mai 1954.)

Durch Arbeiten von E. A. ZELLER und solche aus unserem Laboratorium ist bekannt, daß verschiedene, besonders aromatische Hydrazinderivate starke Hemmer der Histaminase sind. Einige dieser Derivate sind nur von toxikologischem Interesse, andere hingegen, besonders die von uns bearbeiteten blutdrucksenkenden Phthalazinhydrazine sowie das Isonicotinsäurehydrazid (I.N.H.) von erheblichem praktischem Interesse. Die allgemeine Eigenschaft vieler verschiedenartiger Hydrazinderivate, die Histaminase zu hemmen, kann aber nicht direkt als Anhaltspunkt für eine Beziehung zu dem spezifisch-pharmakologischen Wirkungsmechanismus dieser Derivate angesehen werden. Es ist selbstverständlich, daß so reaktionsfähige Substanzen wie Hydrazine noch eine große Zahl von anderen Reaktionsorten haben können und daß diese für die besondere Spezifität der Wirkung in entscheidender Weise verantwortlich sind. Eine Möglichkeit, eine weitere Differenzierung dieser Wirkungstypen zu erreichen, schien durch die Suche nach einer antagonistischen Beeinflussbarkeit der Histaminasehemmung gegeben, die eventuell geeignet sein könnte, eine differenzierte Analyse der Affinitätsverhältnisse, bzw. des Reaktionsverhaltens zu erreichen. Hinsichtlich des Zusammenwirkens von Hydrazinen mit anderen Substanzen liegt eine Reihe von chemischen Befunden vor. Von biologisch bedeutsamen Untersuchungen sind besonders die von H. ERLÉNMEYER zu erwähnen, der gezeigt hat, daß gewisse tuberkulostatisch wirkende Hydrazine durch Zusatz von Kupfer in ihrer Wirksamkeit sowohl gehemmt, wie unter bestimmten Bedingungen gefördert werden können. Diese und andere Beobachtungen über die Reaktionsfähigkeit von Hydrazinen lenkten unsere Aufmerksamkeit bei der Suche nach Antagonisten der Histaminasehemmung auf die Frage, ob und in welcher Weise Metallsalze die Hydrazinhemmung der Histaminase beeinflussen können.

Bei der Prüfung der Enthemmungswirkung von Metallen ergeben sich gewisse Schwierigkeiten, da auf Grund von Angaben der Literatur (F. BRUNS und G. STÜTTGEN und G. V. R. BORN) bekannt ist, daß die

Wirksamkeit der Histaminase (aus Placenta wie aus Niere) durch Metalle, besonders durch Cu, in eigenartiger Weise beeinflußt werden kann. Aus diesen Arbeiten ergibt sich, daß Kupfer die *Histaminoxidation* durch Histaminase in der Weise verändert, daß das bei der Primäroxidation entstehende Aldehydderivat durch Zusatz von Cu in vollständigerer und verstärkter Weise durch Aldehydoxydase oxydiert wird, d. h. also, daß ein verstärkter Sauerstoffverbrauch auftritt, der auf Aktivierung dieser Sekundärreaktion in Form einer Fermentkatalyse durch das Schwermetall erfolgt. Ein solcher katalysierender Einfluß von Kupfer ist nach den Befunden von BORN (l. c.) dagegen nicht bei der Oxydation des *Cadaverins* durch Histaminase vorhanden. Hier wirkt Kupfer in höheren Konzentrationen sogar schwach hemmend. Auf Grund dieser Befunde schien es uns zweckmäßig für unsere Untersuchungen nicht die Histaminoxidation, sondern die Cadaverinoxidation durch Histaminase als Untersuchungsobjekt zu wählen. Um auch bei der Histaminase-Cadaverinoxidation mit Sicherheit ausschließen zu können, daß die von uns geprüften Metallionen unter den von uns eingehaltenen experimentellen Bedingungen ähnliche Wirkungen, wie Kupfer auf die Histaminase-Histaminreaktion ausüben, schien es uns trotz der Angaben in der Literatur notwendig, Kontrollversuche mit Schwermetall entsprechender Konzentrationen ohne Hydrazinzusatz mitlaufen zu lassen.

Hinsichtlich der Wirkung von Metallen auf die hydrazingehemmte Histamin-Cadaverinoxidation schien uns die Prüfung folgender Fragen von Bedeutung:

1. Können Metalle die Wirkung von Hydrazinen auf die Histaminase verhindern, wenn sie mit diesen gleichzeitig oder vorher dem Enzym zugesetzt werden?
2. Können sie, falls eine solche Wirkung eintritt, auch das bereits durch Hydrazineinwirkung gehemmte Ferment wieder regenerieren, und
3. wirken die Metalle gegenüber verschiedenen Hydrazinen in gleicher Weise oder nicht?

Um eine gewisse Differenzierung an Hemmstoffen zu erreichen, schien es uns zweckmäßig, als Beispiele für die Hydrazinhemmung der Histaminase 1. ein Hydrazinophthalazin mit stark ausgesprochener, langdauernder blutdrucksenkender Wirkung, 2. ein Dihydrazinochinazolin (Präp. 12630) mit fehlender hypotensiver Dauerwirkung, aber annähernd gleich starker Histaminasehemmung, und 3. das I.N.H. als Tuberculostaticum, also drei verschiedene Typen von Hydrazinen pharmakologischen Charakters, für unsere Untersuchungen heranzuziehen.

Die Präparate 1 und 2 gehören chemisch in die Gruppe der Benzodiazine. Wir verwenden diesen Oberbegriff, wenn es sich darum handelt, die Wirkung dieser Präparate gegenüber der des I.N.H. abzugrenzen.

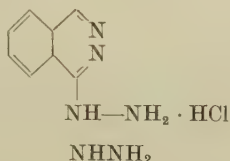
Methodisches.

Als Enzympräparat dienten 48 Std dialysierte Extrakte von Acetontrockenpulver aus frischen Schweinenieren. Einzelheiten der Herstellung des Extraktes sowie der Versuchsansätze für die manometrische Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs nach WARBURG sind einer früheren Mitteilung (W. SCHULER) zu entnehmen. Der verwendete Fermentextrakt war nie älter als 5 Tage. Die Menge Fermentpräparat wurde immer so gewählt, daß der gleiche Umsatz an Substrat pro Zeiteinheit erfolgt. Es zeigte sich, daß unter diesen Voraussetzungen gut reproduzierbare Hemmwerte erhalten werden. Durch Alterung der Extrakte nimmt der sonst sehr geringe Extraktleerversuch zu, die Extrakt-Substratwirkung ab und die Hemmwerte werden inkonstant mit der Tendenz zuzunehmen.

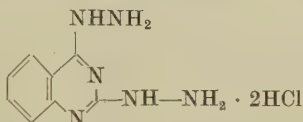
Als *Substrat* diene Cadaverinhydrochlorid.

Hemmstoffe waren:

1. 1-Hydrazino-phthalazin-(HCl)

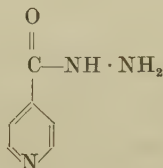


2. 2,4-Dihydrazino-chinazolin-(2HCl)
= Präp. 12630 CIBA



deren Hemmwirkung auf Histaminase bereits früher von uns mit $ED_{50} = 3-6 \cdot 10^{-6}$ (= Effektivdosis für 50%-Hemmung) angegeben wurde (GROSS, SCHULER, TRIPOD, MEIER).

3. Iso-Nicotinsäure-hydrazid (I.N.H.)



von dem ED_{50} zu 10^{-5} gefunden wurde.

In den jetzigen Versuchen wählten wir wiederum die genannten Effektivdosen (50), um sowohl eine allfällige Verminderung wie Verstärkung der Hemmung durch zugegebene Metallionen feststellen zu können.

Die *Elektrolyt-Endkonzentrationen* beziehen sich auf $FeCl_3(6H_2O)$, $CuSO_4(5H_2O)$, $CoCl_2(6H_2O)$, $NiCl_2(6H_2O)$, $MnCl_2(4H_2O)$.

Variationen der Versuchsanordnung.

In orientierenden Versuchen ergab sich, daß der durch Zugabe eines Metallions erzielte Enthemmungseffekt der Hydrazinhemmung verschieden ist, je nachdem ob:

a) Enzym, Hemmstoff und Metall für die Zeit des Temperatenausgleichs von 30 min im WARBURG-Gefäß getrennt waren und erst im Moment des Einkippens mit dem Substrat zusammen kamen;

b) Enzym und Metallion vor dem Kippen 30 min zusammen waren und gemeinsam zum Hemmstoff und Substrat gekippt wurden;

c) Enzym und Hemmstoff 30 min beisammen waren und zum Metallion und Substrat gekippt wurden.

Wir haben in den Tabellen die Variante a) mit (Enz.) (Met.) (Inhibitor), die Variante b) mit (Enz. + Met.) (Inhibitor), die Variante c) mit (Enz. + Inhibitor) (Metall) bezeichnet.

Ergebnisse.

Unsere Versuchsergebnisse sind in den Tab. 1 und 2 übersichtsmäßig geordnet: Die Tab. 1 zeigt die Wirkung der Metallelektrolyte auf die Histaminase-Cadaverinreaktion, die Tab. 2 gibt unsere Resultate geordnet nach dem jeweiligen Hemmstoff unter Angabe der minimal nötigen Elektrolytkonzentrationen zur Erzielung eines bestimmten Enthemmungseffektes.

Da die Feststellung der Wirkung der Metalle auf die Histaminase-Cadaverinreaktion die Grundlage aller weiteren Diskussionen ist, geben wir zunächst die Ergebnisse dieser Versuche.

Tabelle 1.

Elektrolyt	Endkonzentration	Hemmung der Histaminase-Cadaverin-Reaktion in Versuchsanordnung		
		a)	b)	c)
FeCl ₃ (6 H ₂ O)	10 ⁻⁴	0	0	0
CuSO ₄ (5 H ₂ O)	10 ⁻⁴	20—30%	30%	20%
	5 · 10 ⁻⁵	10%	13%	10%
	10 ⁻⁵	0—5%	0—10%	0—5%
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	10 ⁻³	0	0	0
NiCl ₂ (6 H ₂ O)	10 ⁻³	0	—	—
	10 ⁻⁴	0	0	0
MnCl ₂ (4 H ₂ O)	10 ⁻³	7%	10%	7%
	10 ⁻⁴	0	0	0

Aus Tab. 1 ergibt sich, in Bestätigung der Angabe von BORN (l. c.), daß Kupfersulfat eine gewisse Hemmwirkung auf die Histaminase-Cadaverinreaktion zeigt, doch tritt diese erst bei relativ hohen Konzentrationen ein und ist nur gering (E. K. 10⁻⁴: 20—30%). Die anderen Elektrolyte sind vollständig unwirksam in Konzentrationen bis 10⁻⁴, zum Teil bis 10⁻³, nur Manganchlorid zeigt bei 10⁻³ manchmal die Spur einer Hemmung. Auch bei verschiedenen Varianten der Versuchsanordnung, d. h. ob das Metall vorher oder später dem Enzym zugesetzt wird, ändern sich diese Werte nicht wesentlich. Besonders wichtig ist, daß diejenigen Metalle, die für die späteren Untersuchungen von besonderer Bedeutung sind, wie z. B. Kobalt und Nickel, auch bis in hohe Konzentrationen (10⁻³) keinerlei Wirkung auf die Histaminase besitzen. Es kann mit diesen Feststellungen wohl ausgeschlossen werden, daß durch eine Eigenwirkung der Metalle eine Oxydationssteigerung in diesem System vorgetäuscht wird, welche auf einer direkten Reaktion des Metalles beruht. Ferner wurde selbstverständlich ausgeschlossen, daß der Zusatz der Metalle zu der Lösung der Hydrazine in entsprechenden Konzentrationen besonderen Einfluß besitzt.

Eine Zusammenstellung der für unsere Untersuchungen entscheidenden Befunde bei verschiedenen Versuchs- und Konzentrationsvarianten von Enzym, Hydrazin und Metall findet sich in Tab. 2.

Die Ergebnisse sind durchaus eindeutig. In den Versuchsvarianten a und b, welche über die *Verhinderung des Eintrittes* der Hydrazinhemmung durch die Metalle Aufschluß geben, werden die geprüften Hydrazine in ihrer Hemmwirkung auf Histaminase durch das eine oder andere der verwendeten Metalle mehr oder minder stark gehindert. Die Intensität dieser Hinderung ist in der Tab. 2 durch die Endkonzentration an Elektrolyt zum Ausdruck gebracht, die nötig ist, um die Hemmung zu 50% zu verhindern.

Tabelle 2.

Hemmstoff	Elektrolyt	Minimale Endkonzentration an Elektrolyt (+ H ₂ O) um die Hemmung auf etwa die Hälfte zu reduzieren, und zwar in der Versuchsanordnung		
		a) (Enz.) (H.K.) (Met.)	b) (Enz. + Met.) (H.K.)	c) (Enz. + H.K.) (Met.)
Phthalazin .	Fe (Cl ₃)	keine Aufhebung bis 10 ⁻⁴		—
	Cu (SO ₄)	< 10 ⁻⁵	etwa 5 · 10 ⁻⁶	keine bis 10 ⁻⁴
	Co (Cl ₂)	etwa 5 · 10 ⁻⁷	etwa 5 · 10 ⁻⁷	keine bis 10 ⁻⁴
	Ni (Cl ₂)	etwa 5 · 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	keine bis 10 ⁻⁴
	Mn (Cl ₂)	[maximale Aufhebung 1/3 (10 ⁻⁴)]		keine bis 10 ⁻⁴
Präp. 12630	Fe (Cl ₃)	keine Aufhebung bis 10 ⁻⁴		—
	Cu (SO ₄)	[max. Aufhbg. etwa 1/3 (5 · 10 ⁻⁵)]		—
	Co (Cl ₂)	etwa 5 · 10 ⁻⁷	etwa 10 ⁻⁵	keine bis 10 ⁻³
	Ni (Cl ₂)	5 · 10 ⁻⁶	5 · 10 ⁻⁶	keine bis 10 ⁻⁴
	Mn (Cl ₂)	keine Aufhebung bis 10 ⁻⁴		—
I. N. H. . .	Fe (Cl ₃)	keine Aufhebung bis 10 ⁻³		—
	Cu (SO ₄)	keine Aufhebung bis 10 ⁻⁴		—
	Co (Cl ₂)	keine Aufhebung bis 10 ⁻³		—
	Ni (Cl ₂)	[max. Aufhebung um 1/5 (10 ⁻³)]		—
	Mn (Cl ₂)	5 · 10 ⁻⁵	etwa 10 ⁻⁴	keine bis 10 ⁻³

Legende der Versuchsanordnungen: a) (Enzym) (Metall) (Hemmkörper);
b) (Enzym + Metall) (Hemmkörper); c) (Enzym + Hemmkörper) (Metall).

Das hypotensiv aktive Phthalazin und das Chinazolin, dem die hypotensive Dauerwirkung fehlt, verhalten sich hinsichtlich Beeinflussung ihrer Hemmwirkung zunächst insofern ähnlich, als vor allem Kobalt, etwas weniger stark auch Nickel, die Hemmwirkung beider Substanzen verhindern, Eisen und Mangan jedoch nicht —, im Gegensatz zu I. N. H., dessen Hemmwirkung ausschließlich durch Mangan verhindert wird. Andererseits unterscheiden sich aber die beiden Benzodiazine sehr wesentlich dadurch, daß die Hemmwirkung des hypotensiv aktiven Phthalazins auch durch Kupfer verhindert wird, stärker als durch

Nickel, wenn auch weniger stark als durch Kobalt —, während die Wirkung des Präparates 12630, dem die hypotensive Dauerwirkung fehlt, durch Kupfer nicht oder nur gering beeinflußt wird.

In der Versuchsanordnung a) [(Enzym) (Hemmk.) (Metall)] sind die Elektrolyt-Konzentrationen, die nötig sind, die Histaminasehemmung auf etwa die Hälfte zu reduzieren (Tab. 2) manchmal etwas geringer als die nötigen Elektrolytkonzentrationen in der Anordnung b) [(Enzym + Metall) (Hemmkörper)], doch sind die Unterschiede nicht sehr groß, ausgenommen Kobalt auf Präp. 12630, das in b-Anordnung deutlich mehr Metall als in a-Anordnung erfordert.

Am stärksten ausgesprochen ist die histaminaseverhindernde Wirkung von Kobalt auf beide Benzdiazine in Versuchsanordnung a). Um mit Kobaltchlorid die Histaminase hemmende Wirkung von Phthalazin bzw. Präp. 12630 auf die Hälfte zu reduzieren, genügt ein molares Verhältnis von 1 : 8 Phthalazin, bzw. 1 : 14 Präp. 12630.

Daß I.N.H. durch Eisen, Kupfer, Kobalt nicht und durch Nickel nur in ganz geringem Ausmaße in seiner Hemmwirkung behindert wird, könnte damit erklärt werden, daß von I.N.H. etwas zu hohe Konzentrationen mit etwas stärkerer Hemmwirkung verwendet wurden als bei den Benzdiazinen. Daß aber Mangan, das die Hemmung der Benzdiazine nicht beeinflußt, die von I.N.H. im Gegensatz zu allen anderen Metallen sehr deutlich verhindert, kann nicht durch Konzentrationsunterschiede des Hemmkörpers erklärt werden.

Die Versuchsergebnisse zeigen somit mit voller Eindeutigkeit, daß der Eintritt der Hydrazinhemmung der Histaminase durch Metalle verhindert werden kann, daß den Metallen eine gewisse Spezifität in dieser Wirkung zukommt und daß je nach Hydrazin Unterschiede des Spezifitätsgrades nachweisbar sind.

Die weitere Frage, ob auch das durch ein Hydrazin gehemmte Ferment durch Metalle wieder enthemmt, d. h. in seiner Wirksamkeit wieder hergestellt werden kann, läßt sich auf Grund unserer Versuche in der Variante c) [(Enzym + Hemmk.) (Metall)] in eindeutiger Weise negativ beantworten. Auch durch sehr hohe Elektrolytkonzentrationen läßt sich die Fermentaktivität, wenn sie während 30 min durch Hydrazin gehemmt wurde, nicht, auch nicht zum Teil, wieder herstellen. Es scheint aus diesem Befunde hervorzugehen, daß das Hydrazin eine Reaktion mit dem Ferment eingeht, welche zumindest für diese Versuchsbedingungen irreversibel ist. Die Verhinderung der Hydrazinwirkung könnte durch eine Reaktion des Metalls mit dem Hydrazin, oder mit dem Ferment zustandekommen, indem es die Ferment-Hemmstoffbindung blockiert, könnte aber auch dadurch verursacht sein, daß es die Ferment-Substratbindung gegenüber der Ferment-Hemmstoffbindung begünstigt. Versuche zur Charakterisierung des Reaktionsmechanismus sind beabsichtigt.

Die Bedeutung unserer Befunde für die pharmakologische Wirkung der genannten Hydrazine im tierischen Organismus soll an dieser Stelle nicht eingehend diskutiert werden. Immerhin geht aus unseren Befunden mit Eindeutigkeit hervor, wie auch vielleicht auf Grund der Reaktionsfähigkeit der Hydrazine zu erwarten ist, daß diese im Organismus nicht nur der Reaktion mit Enzymen unterliegen, sondern daß auch noch andere im Organismus vorhandene Stoffe als Reaktionsteilnehmer in Betracht gezogen werden müssen.

So ist in der letzten Zeit noch bekannt geworden, was vielleicht hier von Interesse ist, daß die tuberkulostatische Wirkung des Rimifons, z. B. durch Pyridoxal (POPE) und auch durch Hämin (FISHER) aufgehoben wird. Ob diese „Reaktionsteilnehmer“ auch hinsichtlich der Histaminreaktion in Frage kommen, ist vorläufig nicht untersucht worden. Man kann aber bei Zusammenhalt dieser verschiedenen Befunde doch wohl sagen, daß unter den im Organismus vorkommenden Substanzen eine Reihe in bestimmter Weise charakterisierbare Reaktionsteilnehmer biologisch von erheblicher Bedeutung sind. Will man diese Schlußfolgerungen bereits als wahrscheinlich annehmen, so darf wohl gesagt werden, daß der Typus der pharmakologischen Wirksamkeit der Hydrazine möglicherweise davon abhängig ist, welche dieser möglichen Reaktionsorte durch die Hydrazine unter bestimmten gegebenen Verhältnissen z. B. in einem bestimmten Organ oder einem bestimmten Milieu getroffen werden, und daß eben gerade die Skala dieser kompetitiven Reaktionsmöglichkeiten den Wirkungstypus der Phthalazine determinieren könnte. Wir sind uns im klaren, daß eine Reihe von weiteren Untersuchungen notwendig sind, um diese Frage abzuklären, sie scheint aber von einer grundsätzlich so großen Wichtigkeit, daß wir glauben, nicht zögern zu dürfen, bereits heute auf diese Möglichkeit hinzuweisen.

Zusammenfassung.

1. Untersucht wurde sowohl die verhindernde wie auch die aufhebende Wirkung von Fe, Cu, Co, Ni und Mn auf die Hemmwirkung von zwei Benzdiazinen, 1-Hydrazino-phthalazin und 2,4-Dihydrazino-chinazolin (Präp. 12630), sowie von Isonicotinsäurehydrazid (I.N.H.) auf die Histaminase-Cadaverin-Reaktion.

2. Co verhindert in sehr geringer, Ni in etwas höherer Konzentration die Hemmwirkung der Benzdiazine, nicht die von I.N.H.;

Cu verhindert in höherer Konzentration nur die Phthalazinhemmung, nicht die von Präp. 12630 und I.N.H.;

Mn verhindert in höherer Konzentration nur die I.N.H.-Hemmung der Histaminase, nicht die der Benzdiazine;

Fe III beeinflußt die Hemmwirkung der drei Hydrazinderivate, soweit untersucht, nicht.

3. Keines der genannten Metalle vermag die einmal eingetretene Hydrazinhemmung der Histaminase aufzuheben.

Literatur.

BORN, G. V. R.: Brit. J. Pharmacol. **8**, 42 (1953). — BRUNS, F., u. G. STÜTTGEN: Biochem. Z. **322**, 68 (1951). — ERLÉNMEYER, H., S. FALLAB, P. PRIJS u. W. ROTH: Helvet. chim. Acta **37**, 636 (1954). — FISHER, M. W.: Amer. Rev. Tbc. **69**, 469 (1954). — GROSS, F., W. SCHULER, J. TRIPOD u. R. MEIER: Experientia (Basel) **8**, 229 (1952). — POPE, H.: Amer. Rev. Tbc. **68**, 938 (1953). — SCHULER, W.: Experientia (Basel) **8**, 230 (1952). — ZELLER, E. A.: Vgl. The Enzymes: Chemistry a. mechanism of action Sumner and Myrbäck Vol. 2, part. 1, p. 536. New York: Academic Press 1951.

Prof. Dr. W. SCHULER, Wissenschaftl. Lab., CIBA A.G., Basel/Schweiz.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Albert-Ludwig-Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. S. JANSSEN).

Über den Einfluß des Äthyl-Urethans und des Phenyl-carbaminsäure-isopropylesters auf das Lungengewebe der Ratte*.

Von

R. ENGELHORN.

(Eingegangen am 3. Juni 1954.)

Die Frage der Lagerung und Frischhaltung von Kartoffeln wurde durch die Arbeiten von TEMPLEMAN und SEXTON¹² über die Wirkung der Urethane auf die Pflanzenkeimung in eine bis dahin kaum beachtete Richtung gelenkt. Sie stellten dabei fest, daß der Phenyl-carbaminsäure-isopropylester von allen untersuchten Urethanderivaten am wirkungsvollsten war. Schon eine Menge von 300—500 mg/m² verhinderte das Wachstum von Winterroggen. Diese starke, wachstumshemmende Eigenschaft der Verbindung führte in England und Amerika zu ihrer Verwendung als Mittel gegen die Kartoffelkeimung.

Zur gleichen Zeit erschienen die ersten Berichte von NETTLESHIP und HENSHAW⁹ über ein vermehrtes Auftreten von Lungenadenomen bei Mäusen des Stammes C3H als Folge wiederholter Zufuhr von Äthyl-Urethan.

HADDOW und SEXTON¹, HENSHAW und MEYER^{2, 3}, LARSEN^{7, 8}, LARSEN, RHOADS und WEED^{5, 6}, ORR¹⁰, SINCLAIR¹¹ und JAFFÉ⁴ befaßten sich ebenfalls mit diesem Problem. Sie verwendeten aber entweder andere Tierstämme, andere Dosierungen, andere Wege der Zufuhr oder andere Urethanderivate. Die Wirkung der Stoffe auf normale Tiere prüften ORR¹⁰ und JAFFÉ⁴. ORR arbeitete mit Mäusen, JAFFÉ mit Ratten, die jedoch in höherem Alter (etwa 1½ Jahre) einen spontanen Tumorbefall von 5% zeigten.

Die Befunde von NETTLESHIP und HENSHAW⁹ und die praktische Verwendung des Phenyl-carbaminsäure-isopropylesters in der Landwirtschaft veranlaßten uns zu folgenden Untersuchungen:

1. Besteht zwischen Äthyl-Urethan und dem Phenyl-carbaminsäure-isopropylester ein Unterschied der Wirkung auf das Lungengewebe normaler Ratten?

2. Handelt es sich bei eventuell auftretenden Tumoren um bösartige Neubildungen?

3. Bilden sich diese Neubildungen nach Absetzen der Zufuhr dieser Urethane zurück?

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Äthyl-Urethans sind weitgehend bekannt. Es erübrigt sich deshalb, hierauf näher einzugehen.

* Herrn Professor Dr. P. HOFFMANN zum 70. Geburtstag.

Der Phenyl-carbaminsäure-isopropylester ist eine Verbindung, deren Schmelzpunkt bei 87°C liegt und deren Wasserlöslichkeit im Gegensatz zu der des Äthyl-Urethans sehr gering ist. Wir lösten deshalb beide Stoffe, soweit sie als Reinstoffen vorlagen, in Öl. Außerdem verwendeten wir eine 5%ige Beimischung des Phenyl-carbaminsäure-isopropylesters (Pci) zu Kaolinpulver.

Methodik.

Wir verwendeten für unsere Versuche Ratten unserer eigenen Zucht, bei denen bisher keine Spontantumoren gesehen wurden. Wir entnahmen davon zu Vorversuchen 6 weiße, 6 schwarz-weiße und 6 rot-weiße Ratten, die zur Prüfung ihrer Resistenz gegenüber den zu untersuchenden Stoffen mit hohen Dosen von Phenyl-carbaminsäure-isopropylester (500 mg/Tier und Tag) gefüttert wurden. Hiervon starben innerhalb 4 Wochen alle schwarz-weißen, 4 rot-weiße und nur 1 der weißen Ratten. Die überlebenden Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet. Die Lungen der verstorbenen und getöteten Ratten wurden makroskopisch untersucht. Sie zeigten keine sichtbaren Veränderungen; in der Pleurahöhle fand sich jedoch regelmäßig ein leichter, seröser Erguß. Diesen Erguß beobachteten wir auch im weiteren Verlauf der Untersuchungen bei allen Tieren, die während der Urethanbehandlung starben.

Auf Grund dieses Vorversuches wurden von uns nur weiße Ratten verwendet. 3 Gruppen zu je 9 Tieren erhielten pro Tier und Tag mit dem Futter zugeführt:

1. Gruppe: 15 mg Phenyl-carbaminsäure-isopropylester als 5%ige Beimischung zu Kaolinpulver.

2. Gruppe: 10 mg Phenyl-carbaminsäure-isopropylester als 3%ige ölige Lösung.

3. Gruppe: 10 mg Äthyl-Urethan als 3%ige ölige Lösung.

4. Gruppe: 12 Kontrolltiere.

Als Futter wurde folgender Brei gegeben:

500 g Roggenschrot, 500 g Haferflocken, 100 g Trockenmilch, 50 g Lebertran, 10 g Trockenhefe, 20 g Salzgemisch nach McCOLLUM. Das Ganze wurde mit 2 l Wasser gekocht und in Breiform gegeben. Außerdem erhielten die Ratten 3—4 mal wöchentlich Grünzeug. Die Futtermenge war so bemessen, daß eine vollständige Aufnahme der Substanzen sichergestellt war.

Wir wählten den Weg der Verfütterung der Substanzen deshalb, weil die Aufnahme bei dem vorgesehenen Verwendungszweck auf demselben Wege erfolgen würde.

Die Versuchsdauer betrug bei der 1. Gruppe 18 Monate, bei den anderen Gruppen 15 Monate. Von Gruppe 1 wurden nach 10monatiger Versuchsdauer 3 Tiere von der Fütterung mit dem Pci-Kaolin-Gemisch abgesetzt und weitere 8 Monate bis zum Ende des Versuches am Leben belassen. Nach Abschluß der Versuche wurden die Tiere mit Leuchtgas getötet, nach makroskopischer Untersuchung der inneren Organe die Lungen entnommen und in 10%iger Formalinlösung fixiert. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin und nach VAN GIESON.

Ergebnisse.

Um einen Überblick über die Entwicklung der Lungenveränderungen zu erhalten, wurden schon nach 5monatiger Versuchsdauer (8 Monate bei Gruppe 1) 3 Tiere der Gruppen 1—4 getötet. Weder makroskopisch noch mikroskopisch wurde dabei ein Unterschied gegenüber den Kontrollratten festgestellt.

Von den Gruppen 2—4 wurden 3 weitere Tiere nach 7 Monaten getötet, während 3 Ratten der Gruppe 1 von der Zufuhr des Kaolin-Pei-Gemisches abgesetzt und bis zum Versuchsende am Leben belassen wurden. Die Lungen der getöteten Urethantiere zeigten sowohl an ihrer Oberfläche als auch in tieferen Lagen kleine, etwa $\frac{1}{2}$ mm große, unscharf begrenzte Fleckchen von gelblicher Farbe, die bei den Kontrollen nicht gesehen wurden. Mikroskopisch war das Lungengewebe weitgehend normal, das peribronchiale Lymphgewebe war aber wesentlich verbreitert. An einzelnen Stellen fanden sich leichte Ausweitungen der Bronchen. Am Ende des Versuches, d. h. nach 15monatiger Verfütterung der Substanzen an die Gruppen 2 und 3 (18 Monate Gruppe 1) bot sich makroskopisch folgendes Bild:

Bei allen Tieren fanden wir mehr oder weniger große, oft ganze Lungenlappen umfassende, gelbe Knoten, die einzeln oder in Gruppen vorkommend, über die Lungenoberfläche höckerig hervorstanden. Beim Durchschneiden dieser Knoten sahen wir eine Höhle, aus der sich auf Druck eine gelbe, gallertige Masse herauspressen ließ. Diesen Befund erhoben wir sowohl bei den mit Äthyl-Urethan als auch bei den mit dem Phenyl-carbaminsäure-isopropylester gefütterten Ratten. Das gleiche Bild zeigten auch diejenigen Tiere, die nur 10 Monate mit dem Pei gefüttert und weitere 8 Monate am Leben belassen wurden.

Die mikroskopischen Stufenschnitte dieser Lungen ergaben übereinstimmend, daß es sich bei den makroskopisch beschriebenen Veränderungen nicht um Tumoren handelte, vielmehr fanden sich in den Herden große Bronchiektasen, in deren Bereich das Bronchialepithel zum Teil desquamiert war. An den Stellen der Desquamation sahen wir reichlich Histiocyten in das Bronchiallumen eindringen. Die Menge der eingedrungenen Histiocyten konnte so groß sein, daß ein Großteil der Füllung aus diesen Zellen zu bestehen schien. Bei flüchtiger Betrachtung des Präparates konnte so zunächst der Anschein erweckt werden, als handle es sich um eine „adenoide Vegetation“, die genauere histologische Untersuchung ergab dann aber eindeutig den vorher beschriebenen Befund von Bronchiektasen. In jedem Falle bestand eine intensive entzündliche Reaktion der bronchiektatisch erweiterten Bronchen sowie deren Umgebung.

In der menschlichen Pathologie ist die Entwicklung derartiger Erscheinungen entweder bei ausgedehnten Verwachsungen zwischen den Lungen und dem Zwerchfell bekannt, oder aber man findet die Verlegung eines Bronchus durch einen gutartigen Tumor, z. B. ein Adenom oder Karzoid des Bronchus. Wir schnitten deshalb die Bronchen unserer Tiere in Längsrichtung auf, konnten aber keinen derartigen Befund erheben. Dafür stießen wir bei der mikroskopischen Untersuchung auf starke Infiltrationen der größeren Bronchen in Hilusnähe durch

wuchernde lymphatische Reticulumzellen und lymphocytäre Ansammlungen, wobei reichlich Mitosen zu beobachten waren. Da bei der Ratte schon normalerweise eine starke lymphatische Wucherung in der Wand der größeren Bronchen zu sehen ist, konnte die Entwicklung der Bronchiektasen nicht auf eine Einengung der Stammbronchen durch diese Infiltrate zurückgeführt werden. Die Ursache dieser Veränderungen war demnach nicht zu finden.

Bei der Untersuchung der unbehandelten Kontrolltiere ließ sich makroskopisch an den Lungen kein pathologischer Befund erheben. Mikroskopisch wurden jedoch in geringerem Maße ähnliche Veränderungen wie die vorher beschriebenen, festgestellt. Zur Ausbildung von Bronchiektasenhöhlen kam es nicht, es fanden sich aber an verschiedenen Stellen der Lungen Ausweitungen der Bronchiallumen mit peribronchialen Infiltrationen der oben beschriebenen Art.

Besprechung der Ergebnisse.

Entgegen den Befunden der früheren Untersucher^{1, 11} beobachteten wir nach der bisher längsten Dauer der Zufuhr von Äthyl-Urethan und Phenyl-carbaminsäure-isopropylester in subnarkotischen Dosen weder makroskopisch noch mikroskopisch die Entwicklung echter Geschwülste wie Adenome oder Carcinome in den Lungen normaler Ratten. Es entstanden jedoch schwerste Bronchiektasen und Peribronchitiden, die das Ausmaß ähnlicher Veränderungen bei den Kontrolltieren bei weitem übertrafen. Bei Tieren, die nur 10 Monate den Phenyl-carbaminsäure-isopropylester verfüttert bekamen, konnte nach weiteren 8 Monaten eine Rückbildung der beschriebenen Erscheinungen nicht festgestellt werden. Ebenso bestand kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen Äthyl-Urethan und dem Phenyl-carbaminsäure-isopropylester.

Bei den entstandenen großen Substanzverlusten der Lungen scheint ein Ersatz nicht mehr möglich gewesen zu sein. Außerdem bestand durch den fortwährenden Gewebszerfall innerhalb der Höhlen ein andauernder Entzündungsreiz.

Die in unseren Versuchen verwendeten Mengen des Phenyl-carbaminsäure-isopropylesters lagen weit über denen, die im ungünstigsten Falle mit der menschlichen Nahrung aufgenommen werden könnten. Die Verwendung von 8—12 g der 5% igen Pci-Kaolin-Mischung pro Zentner Kartoffeln war vorgesehen. Dies entspräche einer Menge von rund 200 mg pro Kilogramm mit einem Gehalt an Pci von 10 mg.

Insgesamt wurden während des Versuches pro Tier folgende Mengen verfüttert:

1. Gruppe: a) 18 Monate Fütterung mit dem Pci-Kaolin-Gemisch: 8100 mg Pci (162 g Pci-Kaolin).

b) 10 Monate Fütterung mit dem Pei-Kaolin-Gemisch: 4570 mg Pei (91,4 g Pei-Kaolin).

2. Gruppe: 15 Monate Fütterung mit Pei als Reinsubstanz: 4560 mg,

3. Gruppe: 15 Monate Fütterung mit Äthyl-Urethan als Reinsubstanz: 4560 mg.

Diese Mengen sind wesentlich größer als die, die von den angeführten Untersuchern verfüttert oder gespritzt wurden.

Anders liegen die Verhältnisse im Falle der Mast, besonders der Schweinemast, wo ungereinigte Kartoffeln Verwendung finden. Hier könnte ein Einfluß auf das Lungengewebe der Tiere erwartet werden.

Zusammenfassung.

Nach 15- bzw. 18monatiger Verfütterung von Äthyl-Urethan und Phenyl-carbaminsäure-isopropylester in ölicher Lösung und als Pulver an normale Ratten, konnte das Auftreten von Lungenadenomen oder anderen Lungentumoren nicht beobachtet werden. Bei allen Versuchstieren fanden sich jedoch schwerste Bronchiektasen und starke entzündliche Reaktionen im Peribronchialgebiet. Ein Wirkungsunterschied zwischen Äthyl-Urethan und Phenyl-carbaminsäure-isopropylester bestand nicht.

Für die Hilfe bei der histologischen Auswertung der Ergebnisse bin ich dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br., insbesondere Herrn Professor Dr. F. BÜCHNER zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

- ¹ HADDOW, A., and W. A. SEXTON: Influence of carbamic esters (urethanes) on experimental animal tumors. *Nature (Lond.)* **157**, 500—503 (1946). — ² HENSHAW, P. S., and H. L. MEYER: Minimal number of anaesthetic treatments with urethane required to induce pulmonary-tumors. *J. of Canc.* **4**, 523—525 (1943—1944). — ³ HENSHAW, P. S., and H. L. MEYER: Further studies on urethane-induced pulmonary tumors. *J. of Canc.* **5**, No. 6, 415—417 (1945). — ⁴ JAFFÉ, W. G., and R. JAFFÉ: Carcinogenic action of ethyl-urethane on rats. *J. Canc. Res.* **7**, 107—112 (1947). — ⁵ LARSEN, C. D., P. B. RHOADS and L. L. WEED: Survey of hypnotics in general with regard to pulmonary-tumor induction in mice. *J. of Canc.* **7**, No. 1, 5—8 (1946). — ⁶ LARSEN, C. D., L. L. WEED and P. B. RHOADS: Pulmonary tumor induction by transplacental exposure to urethane. *J. of Canc.* **8**, No. 2, 63—70 (1947). — ⁷ LARSEN, C. D.: Pulmonary-tumor induction with alkylated urethanes. *J. of Canc.* **9**, 35—37 (1948). — ⁸ LARSEN, C. D.: Evaluation of the carcinogenicity of a series of esters of carbamic acid. *J. of Canc.* **8**, No. 3, 99—101 (1947). — ⁹ NETTLESHIP, A., P. S. HENSHAW and H. L. MEYER: Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl-carbamate. (Urethane.) *J. of Canc.* **4**, 309—319 (1943—1944). — ¹⁰ ORR, J. W.: The induction of pulmonary adenomata in mice by urethane. *Brit. J. Canc.* **1**, 311—316 (1947). — ¹¹ SINCLAIR, J. G.: Delayed action of urethane producing diverse tumors in mice. *Texas Rep. Biol. a. Med.* **7**, No. 3, 456—461 (1949). — ¹² TEMPLEMAN, W. G., and W. A. SEXTON: Effect of some arylcarbamic esters and related compounds upon cereals and other plant species. *Nature (Lond.)* **156**, No. 3969, 630 (1945).

Dr. R. ENGELHORN, Freiburg i. Br.,
Pharmakologisches Institut der Albert-Ludwig-Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN).

Untersuchungen über die Hemmung der Blutgerinnung durch Bienengift.

Von

ERNST HABERMANN.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. April 1954.)

Tierische Gifte können bezüglich ihrer Wirkung auf die Blutgerinnung in zwei Gruppen eingeteilt werden: in gerinnungsfördernde und -hemmende (vgl. HOUSSAY u. SORDELLI).

Die fördernden wirken vorwiegend thrombinartig; am Ganztier ist Gerinnungsbeschleunigung und -hemmung beobachtet worden (BRAINARD; HEIDENSCHILD; MELLANBY; LINK; HOUSSAY u. SORDELLI), ähnlich wie etwa Thrombin in kleinen Dosen zunächst die Gerinnbarkeit von Plasma erhöht, in höheren das Blut ungerinnbar macht (vgl. SEEGER). Die Gerinnungshemmung durch Colubridengifte (MORAWITZ; HIRSCHFELD u. KLINGER; HOUSSAY; KRUSE u. DAM; FLECKENSTEIN u. O. FETTIG) und durch Bienengift (DYCKERHOFF u. MARX) wird auf Thromboplastin-Inaktivierung bezogen. Bei Viperidengiften dürften auch Thrombin- und Fibrinogenzerstörung eine Rolle spielen (BILLING; EAGLE). Andererseits können bestimmte Schlangengifte Prothrombin in Thrombin umwandeln (EAGLE), und Bienengift enthält eine fibrinogenfällende Komponente (DYCKERHOFF u. MARX).

Im Rahmen von Untersuchungen über Fraktionierung und Wirkungsmechanismus tierischer Gifte fanden wir, daß die Blutgerinnungshemmung beim Bienengift im wesentlichen von der elektrophoretischen Fraktion II verursacht wird (NEUMANN, HABERMANN u. AMEND), welche am Ganztier und an isolierten Organen pharmakologisch inaktiv zu sein scheint, aber die gesamten bisher bekannten Fermentwirkungen des Giftes enthält [NEUMANN u. HABERMANN (1)]. Über Eigenschaften der in dieser Fraktion enthaltenen Phospholipase A haben wir an anderer Stelle berichtet [NEUMANN u. HABERMANN (2)], auch über ihren hemmenden Einfluß auf die Hitzekoagulation von Eigelb (HABERMANN u. NEUMANN).

Hier soll die Thromboplastin-Inaktivierung durch Bienengift näher behandelt werden (vgl. auch NEUMANN).

Methodik.

a) *Substanzen.* Das über das Pikrat gereinigte Bienengift wurde uns von der Firma H. Mack Nachf., Illertissen, überlassen, die Fraktion I chromatographisch von F. G. FISCHER und W. P. NEUMANN dargestellt.

Ein Thromboplastinpräparat aus Hirn bereiteten wir nach SCHULTZE: 1 Teil frisches, von Blut und Hirnhäuten möglichst befreites Kaninchenhirn und 4 Teile physiol. Kochsalzlösung 2 min homogenisiert; Homogenat zur Inaktivierung anderer,

die Blutgerinnung beeinflussender Faktoren 30 min im Wasserbad auf 56° C gebracht, 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert, das Überstehende durch ein Faltenfilter gegossen und im Eisschrank aufbewahrt. Das Präparat wurde jede Woche frisch bereitet. Zum Vergleich wurde auch Lungen-Thromboplastin (Thromboplastin „Roche“) herangezogen.

Der Veronal-Natriumacetat-Puffer (pH 7,5) wurde nach SCHULTZE hergestellt, das menschliche Citratplasma (4 Teile Blut und 1 Teil 3,8% iger Natriumcitratlösung 5 min bei 3200 U/min zentrifugiert) wurde 2—5 Std nach der Entnahme verwendet.

b) *Allgemeine Versuchsanordnung.* Bebrütung und Koagulation wurden scharf getrennt. Die Bebrütung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, 2 Std bei 37° C und pH 7,5; anschließend wurde der Ansatz in Eiswasser gebracht. Die Koagulation erfolgte bei 25° C durch Zusatz von Calciumchlorid (in Veronapuffer) und Citratplasma (Plasma-Endkonzentration $\frac{1}{8}$). Es erscheint aus zwei Gründen günstiger, sie nicht bei 37° C durchzuführen: bei 25° C ist die Gerinnung etwas verzögert, so daß kurze Zeiten genauer bestimmbar werden; außerdem wird eine 37° C warme Lösung selbst bei Benutzung temperierter Pipetten relativ stärker abgekühlt als eine 25° C warme.

Alle 5 sec wurde eine Platinöse aus dem Koagulationsansatz gezogen bis zum Erscheinen des ersten Fibrinfadens. Um die Änderung der Gerinnungsfreudigkeit des Plasmas während des Stehens nach dem Abzentrifugieren möglichst auszuschalten, erfolgten Kontroll- und Versuchsansatz der gleichen Giftkonzentration alternierend, fast immer in Doppelbestimmungen. Die Streuung liegt bei Koagulationszeiten unter 60 sec im Bereich des Ablesefehlers, bei längeren Zeiten ist der Eintritt der Gerinnung weniger genau bestimmbar (vgl. ASTRUP u. DARLING). Durch mindestens 2 giftfreie Kontrollen wurde die Gerinnung des rekalkifizierten Plasmas für sich und bei Zusatz von unvergiftetem Thromboplastin bestimmt; sie erfolgte im ersten Falle — von Plasma zu Plasma verschieden — in der Regel nach 200—300 sec, im zweiten je nach dem Alter der Hirnemulsion nach 30—60 sec.

Auf eine Eichung der unvergifteten Hirn-Thromboplastin-Suspension in Einheiten wurde verzichtet; denn die Aktivität der Suspension ändert sich von Tag zu Tag und die Koagulationsbereitschaft des verwendeten Plasmas im Laufe einiger Stunden, so daß laufend neue Eichungen notwendig gewesen wären. Schließlich ist nach ASTRUP u. DARLING selbst unter Versuchsbedingungen, die im Vergleich zu den unseren relativ einfach sind, die Bestimmung einer unbekannten Thromboplastinkonzentration im günstigsten Falle mit einer Fehlerbreite von 20% behaftet.

Ergebnisse.

1. Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Giftkonzentration.

Die Gerinnungszeit unterliegt unter unseren Versuchsbedingungen mehreren von Tag zu Tag veränderlichen Faktoren: Das Plasma der einzelnen Spender gerinnt verschieden schnell, auch in Abhängigkeit von der Zeit, die es nach der Entnahme zunächst stehen bleibt. Auch die von uns vorwiegend benutzte Hirn-Thromboplastin-Suspension ändert selbst im Eisschrank ihre Aktivität und bleibt nur etwa 1 Woche lang brauchbar. So ist es verständlich, daß die Absolutwerte der Gerinnungszeit an den einzelnen Tagen verschieden ausfallen. Deshalb wurde täglich eine Eichkurve für Thromboplastin hergestellt, das mit verschiedenen Giftkonzentrationen behandelt war (vgl. Abb. 1).

Wie man aus Abb. 1 sieht, ist der Logarithmus der Gerinnungszeit der Giftkonzentration annähernd proportional. Eine eben noch nachweisbare Gerinnungsverzögerung wurde unter unseren Bedingungen bei den

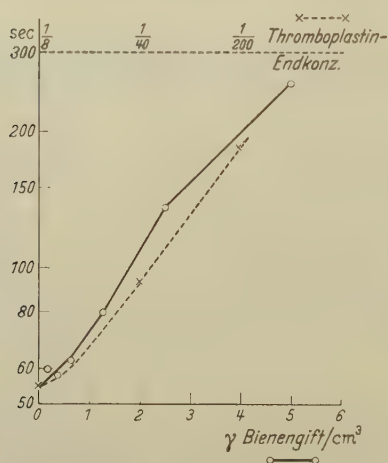


Abb. 1. Abhängigkeit der Gerinnungszeit (Ordinate) von der Giftkonzentration (untere Abszisse) im Bebrütungsansatz; Ansätze: siehe Text. Obere Abszisse: Thromboplastin-Endkonzentration bei Koagulation; Ansätze wie bei Abb. 2. Gestrichelt: Aktivität von nicht mit Bienengift bebrütetem Thromboplastin gegenüber dem gleichen Plasma.

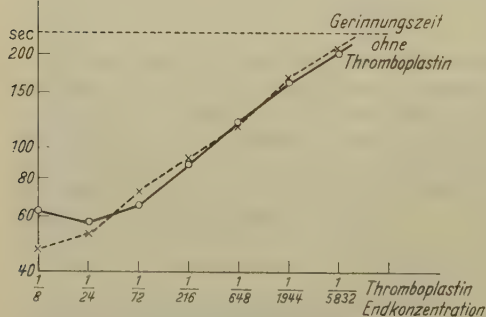


Abb. 2. Gerinnungszeit bei verschiedenen Konzentrationen von Hirn- bzw. Lungenthromboplastin. Ordinate: Gerinnungszeit in sec. Abszisse: Thromboplastin-Endkonzentration bei Koagulation. Ansätze: 0,1 cm³ Thromboplastin-Kochsalzlösung + 0,5 cm³ Veronalpuffer + 0,1 cm³ 0,5%iger CaCl₂-Lösung + 0,1 cm³ Citratplasma. ----- Lungen-Thromboplastin, ——— Hirn-Thromboplastin.

einzelnen Thromboplastinpräparaten durch Giftkonzentrationen von etwa 0,1 bis 1,0 γ/cm³ erzielt. Durch hohe Giftkonzentrationen wird neben dem direkt bebrüteten Thromboplastin auch noch das im zugesetzten Plasma enthaltene merklich inaktiviert; mit Bienengift behandelte Ansätze können daher eine längere Gerinnungszeit erreichen als die Kontrollen, was übrigens schon aus Befunden von FLECKENSTEIN u. FETTIG hervorgeht.

Wir versuchten, den Grad der fermentativen Inaktivierung zu bestimmen, indem wir die Wirkung des vorbebrüteten Fermentpräparates mit der von lediglich verdünntem Thromboplastin verglichen. Nach MILLS besteht umgekehrte Proportionalität zwischen dem Logarithmus der Thromboplastinkonzentration und dem Logarithmus der Gerinnungszeit, was von ASTRUP und DARLING (Lungen-Thromboplastin) bestätigt wurde und in einem bestimmten Bereich auch für die von uns verwendeten Präparate aus Lunge und Hirn gilt (Abb. 2).

Kombiniert man diese Beziehung mit der zwischen Gerinnungszeit und Giftgehalt, so sollte bei gleich langer Einwirkung der Logarithmus der Thromboplastin„konzentration“ der Bienengiftkonzentration

tration annähernd umgekehrt proportional sein. Ein derart einfacher Zusammenhang ist jedoch nicht gegeben; denn das aus Hirn- und Lungen-Thromboplastin durch phospholipasehaltige tierische Gifte entstehende Lysocithin vermag seinerseits intaktes Thromboplastin zu hemmen. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß bei der Reaktion zwischen Gift und Thromboplastin Spaltstücke entstehen, welche ihrerseits noch thromboplastisch wirken.

2. Zeitlicher Ablauf der Thromboplastin-Inaktivierung.

Die Gerinnung tritt um so später ein, je länger das Bienengift auf das Thromboplastinpräparat eingewirkt hat (Tab. 1). Eine totale Inaktivierung von zugesetztem Thromboplastin ist möglich. In einem bestimmten Bereich ist, wie schon erwähnt, der Logarithmus der Gerinnungszeit dem der Thromboplastinkonzentration umgekehrt proportional. Bei hohem Thromboplastingehalt tritt aber mit der Verdünnung bzw. mit der Inaktivierung des Thromboplastins zunächst nur eine relativ geringe (Lungenpräparat) oder keine (Hirnpräparat) Verlängerung der Gerinnungszeit ein (Abb. 2). Da aber das Bienengift schon während der ersten 10–30 min seiner Einwirkung ein sehr beträchtliches Ansteigen der Gerinnungszeit auslöst (Tab. 1), muß angenommen werden, daß die Inaktivierung in dieser Zeitspanne am intensivsten ist und dann abklingt.

0,1 cm³ Hirn-Thromboplastin und 0,1 cm³ Bienengift-Kochsalzlösung wurden mit 0,4 cm³ Veronalpuffer (p_H 7,5) 10 bzw. 30, 60 oder 120 min bei 37° C gehalten, danach mit Eiswasser abgekühlt, 3 min auf 25° C vorgewärmt; anschließend wurden 0,1 cm³ 0,5%iger CaCl₂ in Veronalpuffer und 0,1 cm³ Citratplasma zugesetzt. Kontrollen siehe oben.

Tabelle 1. Zeitabhängigkeit der Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).

Bebrütungszeit (min)	Gerinnungszeit (sec) bei Bienengift-Endkonzentration (γ/cm ³):			
	8,3	0,83	0,083	0 (Kontrolle)
10	150—155	75	60—65	55
30	240—245	85	65—70	—
60	270	105—110	65	55
120	320	110—115	65—70	55

3. Temperaturabhängigkeit der Thromboplastin-Inaktivierung.

0,1 cm³ Giftlösung in Veronalpuffer wurden mit 0,1 cm³ Veronalpuffer und 0,1 cm³ Hirn-Thromboplastin 2 Std bei 20, 30, 40 und 50° C bebrütet; anschließend wurden 0,4 cm³ 0,25% Calciumchlorid und 0,1 cm³ Citratplasma (unverdünnt) zugegeben.

Die Aktivität des thromboplastin-inaktivierenden Prinzips nimmt bis 50° zu (Tab. 2). Ob sie oberhalb 50° noch steigen würde, kann nicht gesagt werden, da diese Temperatur unser Thromboplastinpräparat bereits

partiell inaktivierte: die Gerinnungszeit der giftfreien Kontrolle betrug bei dem 50°-Ansatz 95—100 sec, bei den übrigen Ansätzen 35 sec.

Tabelle 2. *Temperaturabhängigkeit der Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).*

Bebrütungs- temperatur °C	Gerinnungszeit (sec) bei Bienengift-Endkonzentration:					
	1 : 300 000	1 : 600 000	1 : 1 200 000	1 : 2 400 000	1 : 4 800 000	0 (Kontrolle)
20	40—45	35	30—35	35	—	35
30	50	35	35	35—40	35—40	30
40	80	60	40	35	35	35
50	190	105	100	85	90	95 (!)

4. *Einfluß von Calciumionen auf die Thromboplastin-Inaktivierung.*

0,1 cm³ Hirn-Thromboplastin wurden mit 0,2 cm³ Giftlösung und 0,2 cm³ 0,5%igem Calciumchlorid 2 Std bebrütet; dann wurden 0,2 cm³ Veronalpuffer und 0,1 cm³ Plasma zugesetzt. Der Kontrolle wurde das Calciumchlorid erst mit dem Citratplasma zugefügt.

Calcium aktiviert in der angegebenen Konzentration den Abbau von Hirn-Thromboplastin stark (Tab. 3). 2stündiger Kontakt von Thromboplastin mit Calcium allein hat dagegen, wie Kontrollversuche ohne Giftzusatz zeigten, keine Aktivierung zur Folge. Bei einem völlig gleichartig angesetzten Versuch mit Lungen-Thromboplastin (Thromboplastin „Roche“) konnte keine Aktivierung der Bienengiftwirkung durch Calcium beobachtet werden.

Tabelle 3. *Calciumionen und Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).*

CaCl ₂ %	Gerinnungszeit (sec; Mittelwerte aus Doppelbestimmung) bei Bienengift-Endkonzentration:				
	1 : 250 000	1 : 500 000	1 : 1 Mill.	1 : 2 Mill.	1 : 4 Mill.
0,2	310	185—190	110	75	60
0	265	100—105	70	50	50

5. *Einfluß von Natriumcitrat.*

0,1 cm³ Hirn- bzw. Lungen-Thromboplastin wurde mit 0,1 cm³ Gift in Veronalpuffer, 0,1 cm³ Natriumcitrat (3,3%ig in Veronalpuffer) 2 Std bei 37° C gehalten; anschließend erfolgte Zusatz von 0,3 cm³ Puffer + 0,1 cm³ 3,3%igem Calciumchlorid; nach 1 min wurde 0,1 cm³ Plasma zugefügt. Kontrolle: 0,1 cm³ Thromboplastin + 0,1 cm³ Gift + 0,1 cm³ Puffer; 2 Std 37° C; anschließend Zusatz von 0,1 cm³ Natriumcitrat + 0,1 cm³ Calciumchlorid + 0,2 cm³ Puffer; nach 1 min + 0,1 cm³ Plasma.

Natriumcitrat hemmt die Thromboplastin-Inaktivierung durch Bienengift, der Versuch verläuft mit Hirn- und Lungen-Thromboplastin im gleichen Sinne (Tab. 4). Dieser in Anbetracht der Aktivierung durch Calcium nicht überraschende Befund stimmt gut überein mit Ergebnissen,

die wir bei der Prüfung der Lecithinspaltung (NEUMANN u. HABERMANN) und der Hemmung der Dotterkoagulation (HABERMANN u. NEUMANN) durch Bienengift bzw. durch dessen Phospholipase A erhielten; sie entsprechen auch den Beobachtungen von FLECKENSTEIN u. GERKHARDT im Dehydrasentest. In all diesen Anordnungen aktiviert Calcium die Bienengiftwirkung, wie man durch Calciumentzug (Eigelb-Lecithasetest, Dotterkoagulation) oder durch Calciumentzug und -zugabe (Lecithasetest im Lecithin-Methanol-Ansatz, Dehydrasentest) nachweisen kann.

Tabelle 4. *Citrat und Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).*

Natr.-Citr. %	Gerinnungszeit (sec; Mittelwerte aus Doppelbestimmung) bei Bienengift-Endkonzentration:					
	1:150000	1:300000	1:600000	1:1200000	1:2400000	0 (Kontrolle)
1,1	70	50	45	45—50	45	35—40
0	210	90—95	70	55—60	50—55	30—35

Von anderen die Bienengiftwirkung auf die Dotterkoagulation beeinflussenden Substanzen war Natriumfluorid (0,003 mol im Bebrütungsansatz) ohne eindeutigen Einfluß; allerdings wirkt diese Konzentration auch im Lecithasetest (beide Methoden) kaum mehr; bei höheren Konzentrationen störte die Niederschlagsbildung. Phloridzin ($\frac{1}{2}$ gesättigt) war in Übereinstimmung mit Angaben von FLECKENSTEIN u. FETTIG ohne sicheren Effekt; auch Zusatz von Kaliumcyanid (0,003 mol Endkonzentration bei Bebrütung) oder von Schwefelwasserstoff ($\frac{1}{4}$ Sättigung bei Bebrütung) hatte kein eindeutiges Ergebnis.

6. Einfluß von Zinkionen auf die Thromboplastin-Inaktivierung.

0,1 cm³ Hirn- bzw. Lungen-Thromboplastin mit 0,1 cm³ Zinkchlorid (0,001 bzw. 0,0002 mol) -Veronalpuffer, in dem gleichzeitig das Gift gelöst ist, 2 Std bei 37° C gehalten; anschließend Zusatz von 0,4 cm³ Puffer, 0,1 cm³ 0,5% igem Calciumchlorid und 0,1 cm³ Plasma. Beim Kontrollversuch wurde Zinkchlorid erst nach der Bebrütung zugegeben.

Zinkionen hemmen wie im Lecithasetest [beide Methoden, siehe NEUMANN und HABERMANN (2)], im Dotterkoagulationstest (FLECKENSTEIN u. GERKHARDT, HABERMANN u. NEUMANN) und im Dehydrasentest (FLECKENSTEIN u. GERKHARDT) so auch die Thromboplastin-Inaktivierung durch Bienengift in sehr geringer Konzentration (Tab. 5). Es

Tabelle 5. *Zinkionen und Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).*

Zinkchlorid	Gerinnungszeit (sec; Mittelwerte aus Doppelbestimmung) bei Bienengift-Endkonzentration:					
	1:100000	1:200000	1:400000	1:800000	1:1600000	0 (Kontrolle)
0,0005 m	120	95	90	85	71—75	70
0	300—400	ca. 200	125—130	100—105	90	70
0,0001 m	180—185	125	95—100	85—90	85	60
0	>300	195	130—135	110—115	100—105	60

handelt sich dabei nicht um eine Zinkwirkung auf Thromboplastin; denn Zink allein war in den hier vorliegenden Konzentrationen ohne Einfluß auf Thromboplastin, und durch höhere Konzentrationen wird, wie besondere Versuche zeigten, die Blutgerinnung gehemmt.

7. Jod und thromboplastin-inaktivierendes Prinzip.

Wie wir gezeigt haben, [NEUMANN u. HABERMANN (2) HABERMANN u. NEUMANN] wird die Phospholipase A des Bienengiftes bereits durch minimale Jodmengen (1:10⁶) gehemmt.

Bei p_H 7,0 inaktiviert Jod den Thromboplastinabbau durch Bienengift (Tab. 6).

Tabelle 6. Jod und Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat).

Vorbehandlung mit Jod	Gerinnungszeit (sec; Mittelwerte aus Doppelbestimmung) bei Bienengift-Endkonzentration:					
	1: 200 000	1: 400 000	1: 800 000	1: 1 600 000	1: 3 200 000	0 (Kontrolle)
1:200 000	75	55—60	50	45—50	45—50	45
0	>240	115—120	70—75	65	55—60	45

Auf 0,1 cm³ Giftlösung in Veronalpuffer (p_H 7,0) ließ man 0,1 cm³ Jodlösung 1:100 000 in Kaliumjodid 1:10 000 in Puffer 30 min einwirken; anschließend wurde mit 0,1 cm³ Aqua dest. und 0,1 cm³ Hirn-Thromboplastin 2 Std bei 37° C gehalten, dann erfolgte Zusatz von 0,1 cm³ Veronalpuffer, 0,2 cm³ 0,25% igem Calciumchlorid und 0,1 cm³ Plasma. Dem Kontrollansatz wurde die Jodlösung erst nach der Bebrütung mit Bienengift zugesetzt.

Bei p_H 7,55 konnten wir zwar sowohl in Veronal- als auch in Phosphatpuffer keine eindeutige Jod-Inaktivierung des thrombokinase-abbauenden Prinzips nachweisen; dies dürfte aber auf der bei diesem p_H leicht erfolgenden Disproportionierung einer Jodlösung zu Hypojodit und Jodat beruhen.

8. Thermostabilität des thromboplastin-inaktivierenden Prinzips.

Nach HIRSCHFELD u. KLINGER ist das thromboplastin-inaktivierende Prinzip von Kobragift im Sauren relativ thermostabil, im Alkalischen sehr thermolabil.

Bei Erhitzen von Naja naja-Gift in RINGER-Lösung oder Wasser soll jedoch nach KRUSE u. DAM die gerinnungshemmende Fähigkeit des Giftes weitgehend zerstört werden, die Phospholipaseaktivität aber erhalten bleiben. KRUSE u. DAM schließen daher, die Phospholipase A des Giftes könne nicht für die Thromboplastin-Inaktivierung verantwortlich sein. Die Thromboplastin-Inaktivierung durch Bienengift wird nach Versuchen von FLECKENSTEIN u. FETTIG bei 30 min langem Erhitzen der Giftlösung auf 70° C nicht beeinflusst; erst bei 1stündigem Erhitzen auf 95° C erfolgt eine wesentliche Abschwächung.

Da nach unseren früheren Untersuchungen [NEUMANN u. HABERMANN (2), HABERMANN u. NEUMANN] die Phospholipase A des Bienengiftes relativ thermostabil ist, haben wir angesichts der Stellungnahme von KRUSE und DAM die prinzipiell bedeutungsvolle Frage, ob dieses Ferment an der Thromboplastin-Inaktivierung beteiligt ist, bzw. ob das

dabei aktive Prinzip eine andere Thermostabilität besitzt, eingehend untersucht und auch Parallelversuche mit Giften verschiedener Kobrararten ausgeführt.

Je 1 cm³ Bienengift- bzw. Kobragiftlösung 1:1000 in Kochsalz wurde mit 1 cm³ Phosphat-Citratpuffer nach McILVAINE (pH 2,2, 3,85, 5,95, 7,8), der mit Kochsalz im Verhältnis 1 + 3 verdünnt war, versetzt und 15 min auf 98° C erhitzt. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig 1 cm³ Bienengift bzw. Kobragift 1:1000 mit 1 cm³ Pufferlösung von pH 5,95 bei Zimmertemperatur gehalten. Nachdem mit Salzsäure bzw. Natronlauge neutralisiert und mit Kochsalzlösung weiter verdünnt worden war, wurde 0,1 cm³ Lungen-Thromboplastin mit 0,3 cm³ Veronalpuffer und 0,1 cm³ der vorbehandelten Giftlösung 2 Std bei 37° C gehalten; anschließend erfolgte Zusatz von 0,2 cm³ 0,25%igem Calciumchlorid und 0,1 cm³ Plasma.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden analog Bienen- bzw. Naja naja- und Naja nigricollis-Gift 45 min auf 72° C erhitzt; im übrigen wurde wie oben verfahren. Bei jeder in Tab. 7 verzeichneten Giftart wurde anderes Plasma verwendet, so daß Vergleiche nur innerhalb der einzelnen Gruppen mit der dazugehörigen Kontrolle möglich sind.

Tabelle 7. *Thromboplastin-Inaktivierung (Lungenpräparat)*
durch erhitztes Bienen-, Naja naja- und Naja nigricollis-Gift.

Giftart	Gift erhitzt auf ° C bei pH		Gerinnungszeit ¹ (sec) bei Gift-Endkonzentration:		
			1 : 200 000	1 : 400 000	1 : 800 000
Biene	98	2,2	170	60	60
	98	3,85	250	80	65
	98	5,95	160	75	60
	98	7,90	65	55	45
	Kontrolle	5,95	205	85	60
Naja naja	98	2,2	110	80	65
	98	3,85	140	65	55
	98	5,95	115	75	60
	98	7,90	40	40	40
	Kontrolle	5,95	100	70	50
Biene	72	2,2	130	65	55
	72	4,0	225	60	55
	72	6,0	150	60	50
	72	7,8	130	55	55
	Kontrolle	6,0	155	65	50
Naja naja	72	2,2	150	80	60
	72	4,0	145	75	65
	72	6,0	110	95	75
	72	7,8	125	70	65
	Kontrolle	6,0	125	85	65
Naja nigricollis	72	2,2	150	70	50
	72	4,0	170	60	55
	72	6,0	115	60	55
	72	7,8	75	55	55
	Kontrolle	6,0	175	60	50

¹ Gerinnungszeit der giftfreien Kontrollen: 40—50 sec.

Wie Tab. 7 zeigt, wird die Aktivität von Bienengift und Kobragiften durch Siedehitze bei pH 2,2 bis 6 wenig beeinflusst; bei pH 7,9 dagegen erfolgt rasch eine weitgehende Inaktivierung, welche bei Kobragift noch ausgeprägter ist als bei Bienengift.

Auch bei 72° nimmt die Aktivität der Gifte bei pH 2—6 nicht wesentlich ab. Bei pH 7,8 bemerkt man aber eine deutliche Aktivitätsminderung bei allen 3 Giftarten (Tab. 7). Es besteht also gute Übereinstimmung mit der Thermostabilität der Bienengift-Phospholipase [NEUMANN u. HABERMANN (2), HABERMANN u. NEUMANN] auch in bezug auf die Inaktivierungsrate bei verschiedenem pH .

9. Zur Frage eines Thromboplastin-Abbaus durch Hyaluronidase.

Wie wir schon früher mitteilten [NEUMANN u. HABERMANN (1)], findet sich die thromboplastin-inaktivierende Komponente von Bienengift in der papierelektrophoretischen Fraktion II, welche neben der Phospholipase A noch eine sehr aktive Hyaluronidase enthält. Es erschien zwar von vornherein unwahrscheinlich, daß die Hyaluronidase für die Thromboplastin-Inaktivierung verantwortlich sein könnte, da sie erheblich thermolabiler ist als die Phospholipase (HABERMANN). Von ABUL-HAJ u. Mitarb. ist aber eine thromboplastische Aktivität von Hyaluronat beschrieben worden, von PELLEGRINI u. MODESTI eine Hemmung der 1. Phase der Blutgerinnung durch Hyaluronidase. Deshalb haben wir geprüft, ob Stierhoden-Hyaluronidase (Kinetin-Schering) das von uns benutzte Lungen-Thromboplastin abzubauen vermag.

Als $0,1\text{ cm}^3$ Thromboplastin und $0,2\text{ cm}^3$ Kochsalz mit 0,02 bis 2,0 Einheiten Kinetin 1 Std bei 37° gehalten und dann mit $0,3\text{ cm}^3$ 0,25% igem Calciumchlorid, $0,1\text{ cm}^3$ Kochsalzlösung und $0,1\text{ cm}^3$ Plasma versetzt wurden, trat keine Änderung der Thromboplastinaktivität ein.

10. Lysocithinbildung in Tromboplastinpräparaten und Lysocithinwirkung auf die Blutgerinnung.

Da mit Hilfe von Lipoidextraktionsverfahren u. a. aus Hirn (vgl. FISCHER u. HECHT), Lunge (COHEN u. CHARGAFF) und Blutplättchen (CHARGAFF, BANCROFT u. STANLEY-BROWN) gerinnungsaktive Phospholipoidfraktionen erhalten worden sind, war zu prüfen, in welchem Ausmaß aus den von uns benutzten Präparaten bei der Einwirkung von Bienengift Lysocithin entsteht und inwieweit dieses die Blutgerinnung beeinflusst; HECHT u. OTTENS beschrieben eine Gerinnungshemmung durch hohe Konzentrationen von Lysocithin.

Lysocithin bestimmen wir durch seine hämolytische Wirkung auf gewaschene Erythrocyten (NEUMANN, HABERMANN u. HANSEN). Dabei kann die Gegenwart von Bienengift stören, weil dieses ein starkes, direkt

hämolisierendes Prinzip enthält. Wir benutzten daher als Träger einer Phospholipase A das Gift von *Vipera ammodytes*, welches gewaschene menschliche Erythrocyten nicht angreift, oder das nur schwach direkt-hämolisierende *Naja naja*-Gift. Gleichzeitig überzeugten wir uns, daß dem Thromboplastinpräparat zugesetztes Lysocithin sicher nachweisbar war.

a) Je 0,2 cm³ Lungen-Thromboplastin (1:3 mit SÖRENSEN-Phosphat von p_H 7,0 verdünnt) und 0,2 cm³ *Naja naja*-Gift 1:20000, 1:40000 usw. bis 1:640000 in Phosphatpuffer 2 Std bei 37° C, anschließend Zusatz von 0,4 cm³ 0,6%iger Erythrocytensuspension in Phosphat. Bei 37° C totale Hämolyse in den beiden ersten Röhrchen in 4 min, im dritten in 30 min.

b) Je 0,2 cm³ Thromboplastin + 0,2 cm³ Lysocithin (aus Eigelb) 1:20000 usw. bis 1:160000; anschließend wie oben. Bei 37° C totale Hämolyse im ersten Röhrchen in 4 min, im zweiten nach rund 10 min.

c) Je 0,2 cm³ Puffer + 0,2 cm³ Lysocithin 1:20000 bis 1:160000; sonst wie oben. Totale Hämolyse in den beiden ersten Röhrchen in 20 sec bzw. 4 min.

d) 0,2 cm³ *Naja naja*-Gift 1:20000 in Puffer + 0,2 cm³ Puffer; sonst wie oben. Nirgends Hämolyse.

Die Lysocithinwirkung ist also in Gegenwart von Lungen-Thromboplastin abgeschwächt (b). Dies ist nicht verwunderlich; denn nach COLLIER sind Cholesterin, nach HABERMANN Lecithin und möglicherweise auch andere Lipoide zur Abschwächung der Lysocithinwirkung befähigt. Unter dem Einfluß von Kobragift entsteht in unserem Thromboplastinpräparat hämolysierende Substanz (a); das durch eine Endkonzentration von 1:160000 *Naja naja*-Gift in 2½ Std gebildete Lysocithin vermag die zugesetzten Erythrocyten binnen 30 min komplett aufzulösen, was der Wirkung einer Lysocithinendkonzentration von etwa 1:120000 entspricht. Allerdings gilt dieser Vergleich nur mit Vorbehalt; denn wir wissen nicht, ob das aus unserem Präparat gebildete „Lysocithin“ chemisch und in seiner hämolytischen Aktivität dem Eigelb-Lysocithin entspricht.

Es interessierte ferner, wieviel Thromboplastin notwendig ist, um eine eben noch zur Totalhämolyse hinreichende Menge an Lysoverbindungen zu liefern.

0,5 cm³ Lungen-Thromboplastin verschiedenen Verdünnungsgrades wurden mit 0,5 cm³ Ammodytesgift 1:10000 versetzt und 2 Std bei 37° C gehalten. Nach Zusatz von 1,0 cm³ 0,6%iger Erythrocytensuspension in Phosphatpuffer ergab die auf ¼ verdünnte Thromboplastinemulsion bei 37° C binnen 25–30 min Totalhämolyse, die auf ⅛ verdünnte nur noch partielle. Verlängerung der Inkubation auf 4 Std erhöhte den Hämolysegrad nicht mehr nennenswert.

Kombiniert man diese Befunde mit den oben unter a—d genannten, so ergibt sich, daß aus 1 cm³ unserer Thromboplastinemulsion rund 0,1–0,2 mg „Lysocithin“ entstehen können. Nun mußte untersucht werden, ob Lysocithin Thromboplastin zu inaktivieren vermag (vgl. Tab. 8).

I. 0,1 cm³ Lysocithin 1:2000 in Veronalpuffer + 0,1 cm³ Lungen-Thromboplastin a) 1:4, b) 1:16, c) 1:64 mit 0,9% Kochsalz verdünnt + 0,4 cm³ Veronalpuffer + 0,1 cm³ 0,5%iges Calciumchlorid + 0,1 cm³ Plasma.

II. Analog mit Lysocithin 1:10000.

III. Analog mit Lysocithin 1:40000.

IV. Kontrolle (statt Lysocithin Veronalpuffer).

V. 0,1 cm³ Lysocithin 1:2000 + 0,1 cm³ Cholesterinemulsion 1:10000 in Veronalpuffer; nach 5 min Zusatz von 0,1 cm³ Thromboplastin + 0,3 cm³ Veronalpuffer + 0,1 cm³ Calciumchlorid + 0,1 cm³ Plasma.

VI. Analog V. mit Lysocithin 1:10000.

Tabelle 8. *Lysocithin und Thromboplastin-Aktivität (Lungenpräparat).*

Reihe (vgl. Text)	Konzentration		Gerinnung nach sec (vgl. Text zu I)		
	Lysocithin	Cholesterin	a	b	c
I	1:16000	0	105	>180	>240
II	1:80000	0	60	150	>240
III	1:320000	0	50	95	220
IV	0 (Kontrolle)	0	50	90	165
V	1:16000	1:80000	70	130	210
VI	1:80000	1:80000	45	75	140

Wie Tab. 8 zeigt, hemmt Lysocithin die Blutgerinnung deutlich; durch Cholesterinzusatz wird dieser Effekt abgeschwächt. Unser Hirn-Thromboplastinpräparat wurde, wenn auch in geringerem Ausmaß, durch Lysocithin ebenfalls inaktiviert.

Nebenbei sei erwähnt, daß auch das als Hämolyticum dem Lysocithin pharmakologisch nahestehende Digitonin die Blutgerinnung verzögert (HERMANNSDORFER; DYCKERHOFF u. MARX, eigene Versuche).

Auf Grund dieser Versuche läßt sich nicht sagen, ob die Koagulationsverzögerung durch den Abbau einer gerinnungsaktiven Phospholipidkomponente bedingt wird oder durch die unter dem Einfluß der Phospholipase A erfolgende Lysocithinbildung; beide Reaktionsmechanismen erscheinen als möglich.

11. Einfluß der Bienengift-Fraktion I auf die Blutgerinnung.

Wir haben früher mitgeteilt [NEUMANN u. HABERMANN (1)], daß in bestimmten Konzentrationsbereichen nur die phospholipasehaltige Fraktion II von Bienengift die Blutgerinnung hemmt. Da wir inzwischen ausreichende Mengen von chromatographisch gewonnener Fraktion I (F. G. FISCHER u. W. P. NEUMANN) erhielten, konnten wir höhere Konzentrationen dieser Komponente am Blutgerinnungssystem prüfen. Den Reinheitsgrad der verwendeten Substanz hatten wir zuvor mit dem Dotterkoagulationstest bestimmt, mit welchem nach HABERMANN u. NEUMANN

die Phospholipase-Aktivität tierischer Gifte gemessen werden kann. Die benutzte FI-Charge enthielt weniger als 0,5% der Phospholipase-Aktivität des Ausgangsgiftes.

0,1 cm³ Gifflösung mit 0,85% Kochsalz wurden mit 0,4 cm³ Veronalpuffer und 0,1 cm³ Hirn-Thromboplastin 2 Std bei 37° C gehalten; anschließend erfolgte Zusatz von 0,1 cm³ 0,5% igem Calciumchlorid und 0,1 cm³ Plasma.

Tabelle 9. *Thromboplastin-Inaktivierung (Hirnpräparat) durch Bienen-Pikratgift und Fraktion I.*

Bienen-Pikratgift		Fraktion I	
Endkonz. γ/cm^3	Gerinnungszeit sec	Endkonz. γ/cm^3	Gerinnungszeit sec
4,15	225	41,5	160
1,04	105	10,4	70
0,26	75	2,6	60—65
0 (Kontrolle)	60	—	—

Aus Tab. 9 geht hervor, daß Fraktion I gegenüber Hirn-Thromboplastin etwa 5% der Wirkung von Bienen-Pikratgift besitzt. Die exakte Angabe einer Verhältniszahl ist nicht möglich, weil die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung bei F I und Pikratgift verschieden ist. Lungen-thromboplastin wird durch F I in ähnlicher Weise inaktiviert. Insgesamt erscheint die Wirkung dieser Fraktion mindestens 10mal stärker als nach dem Phospholipasegehalt des Präparates anzunehmen wäre. Der Angriffspunkt liegt überwiegend am Thromboplastinkomplex:

Als 0,1 cm³ Citratplasma mit 0,1 cm³ einer F I-Veronalpufferlösung 1:32000, 1:8000 und 1:2000 10 min bei 25° C gehalten und dann mit je 0,1 cm³ einer Lungen-Thromboplastin-Kochsalzverdünnung 1:4 und 0,1 cm³ 0,5% igem Chlorecalcium versetzt wurden, erfolgte die Gerinnung in 55 bzw. 60 und 70 sec, bei der giftfreien Kontrolle in 55 sec. Wurde dagegen die F I-Lösung zuerst mit dem Thromboplastin zusammengebracht und dann erst mit Calciumchlorid und Citratplasma versetzt, so verlängerte sich die Gerinnungszeit gegenüber der des Kontrollansatzes von 50 sec auf 60 bzw. 90 und 285 sec.

Fraktion I reagiert aber auch mit Fibrinogen (Tab. 10). Beide Eigenschaften kommen auch dem mit ihr chemisch in gewissem Grade verwandten Protamin zu (TOCANTINS; MYLON, WINTERITZ u. DE SÜTÖ-NAGY). Dieses fällt Fibrinogen nach unseren Untersuchungen etwa 3 bis 4mal stärker als Pikratgift, dieses wieder etwas stärker als Fraktion I, diese wiederum erheblich stärker als ein Präparat von Fraktion II, welches die 8—10fache Phospholipase-Aktivität (HABERMANN u. NEUMANN), aber nur etwa 20% der direkt hämolytischen Aktivität von Gesamtgift besaß. Natives Bienengift war deutlich schwächer wirksam als Pikratgift, was mit seinem geringeren Gehalt an Fraktion I zusammenhängen dürfte.

Bei den Versuchen der Tab. 10 wurden 0,4 cm³ Gift- bzw. Protaminsulfatlösung in Veronal-Salzsäure-Puffer (pH 7,5) mit 0,4 cm³ Fibrinogenlösung 1:500 in 0,85% Kochsalz vereinigt. Die Flockung erfolgte binnen weniger Minuten, die Ablesung nach 2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur.

Tabelle 10.

Fibrinogenfällung durch Bienengift, dessen Fraktionen und Protaminsulfat.

Endkonzentration	Nativgift	Pikratgift	Fraktion I	Fraktion II	Protaminsulfat
1: 20000	++	++	++	+	++
1: 40000	(+)	+	+	((+))	++
1: 80000	∅	(+)	((+))	—	++
1:160000	—	∅	∅	—	(+)
1:320000	—	—	—	—	(+)
1:640000	—	—	—	—	—

++ starke, + deutliche, (+) angedeutete, ∅ keine Flockung.

Besprechung.

Bienengift besitzt, wie schon DYCKERHOFF u. MARX gefunden und unsere Untersuchungen näher gezeigt haben, mindestens 2 Angriffspunkte am Blutgerinnungssystem: es inaktiviert Thromboplastin und es fällt Fibrinogen.

Die Fibrinogenfällung dürfte im wesentlichen durch Fraktion I hervorgerufen werden. Die Thromboplastin-Inaktivierung dagegen ist ganz überwiegend eine Funktion der Fraktion II (NEUMANN, HABERMANN u. AMEND); daneben greift jedoch auch Fraktion I in hohen Konzentrationen am Thromboplastin an. Die beiden Effekte dieser Fraktion sind durch ihre stark basischen, protaminartigen Eigenschaften erklärbar.

Bei der Deutung der Koagulationsverzögerung durch Fraktion II bzw. durch kleine Konzentrationen von Gesamtgift ist davon auszugehen, daß Fraktion II eine starke Hyaluronidase enthält, aus Lecithin eine Fettsäure abspaltet, Dehydrasensysteme inaktiviert und die Hitze-koagulation von Eigelb hemmt. Da die letztgenannten Effekte durch einen Faktor, nämlich Phospholipase A bedingt sind (HABERMANN u. NEUMANN), erhebt sich die Frage, ob das thromboplastin-inaktivierende Prinzip mit einem der beiden Fermente identisch ist oder eine „dritte Komponente“ darstellt.

Gegen eine Identität mit Hyaluronidase spricht der negative Ausfall unseres Versuchs, mit Stierhoden-Hyaluronidase Thromboplastin abzubauen. Ferner enthält das hier benutzte gereinigte (Pikrat-)Gift weniger als 40% jener Hyaluronidase-Aktivität, die es — im Vergleich zu einem nativen Trockengift — auf Grund seiner Fähigkeit zur Thromboplastin-Inaktivierung bzw. zur Phospholipoidsplattung besitzen sollte. Schließlich ist die Bienengift-Hyaluronidase erheblich thermolabiler als das koagulationsverzögernde Prinzip (HABERMANN).

Alle Kriterien sprechen andererseits dafür, daß die Thromboplastin-Inaktivierung durch die Phospholipase A erfolgt: die relativ große Hitze-stabilität des Prinzips im Säuren, seine Hemmbarkeit durch Citrat, die unter bestimmten Bedingungen mögliche Aktivierung durch Ca^{++} , die starke Hemmung durch Zn^{++} und kleinste Joddosen; außerdem gehen Phospholipase-Aktivität und Thromboplastin-Inaktivierung bei verschiedenen Gift-Chargen (HABERMANN) und bei der elektrophoretischen Fraktionierung [NEUMANN u. HABERMANN (1)] einander stets weitgehend parallel. Wenn wir aus allen diesen Gründen schließen, daß die Thromboplastin-Inaktivierung durch Bienengift im wesentlichen durch die darin enthaltene Phospholipase A erfolgt, so befinden wir uns in Übereinstimmung mit HOUSSAY, der die entsprechende Schlangengift-wirkung analog gedeutet hat.

Damit ist jedoch noch nichts über den eigentlichen Wirkungsmecha-nismus ausgesagt; denn es können einerseits gerinnungsaktive Lipide (WOOLDRIDGE) unbekannter chemischer Struktur (CHARGAFF, HECHT) gespalten und damit unwirksam werden, andererseits könnten Spalt-produkte von an sich gerinnungsinaktiven, lipoiden Begleitsubstanzen Thromboplastin inaktivieren. Tatsächlich läßt sich, wie wir oben ge-zeigt haben, durch Lysocithin die Thromboplastinwirkung abschwächen, so daß beide Mechanismen diskutabel bleiben, bis vielleicht eine analoge Untersuchung von Thromboplastinpräparaten, die wesentlich weniger Begleitstoffe enthalten als die uns zur Verfügung stehenden, eine Ent-scheidung gestattet.

FLECKENSTEIN u. O. FETTIG haben Unterschiede zwischen der Inaktivierung von Thromboplastin durch Bienengift einerseits und Schlangengifte andererseits beschrieben: unter ihren Versuchsbedingungen wurde die Bienengiftwirkung durch Citrat aktiviert, die der Schlangengifte gehemmt, was mit unseren Befunden in Widerspruch zu stehen scheint. Bei den von diesen Autoren verwendeten, relativ hohen Giftkonzentrationen dürften aber bereits die zusätzlichen Gerinnungseffekte von Fraktion I bemerkbar werden, so daß mit ihrer Methodik die Identität der Phospholipase A mit dem in niedrigen Konzentrationen koagulationsverzögernden Prinzip nicht ausgeschlossen werden kann.

Inwieweit die Thromboplastin-Inaktivierung durch Schlangengifte auf Phospholipase A zu beziehen ist, kann auf Grund der bisher vor-liegenden Versuche noch nicht abgegrenzt werden. Während KRUSE u. DAM eine solche Beziehung überhaupt ablehnen, fanden wir bei Unter-suchungen mit Schlangengiften einen weitgehenden Parallelismus. Aller-dings liegen bei manchen Schlangengiften erheblich kompliziertere Ver-hältnisse als beim Bienengift vor.

Ein der Thromboplastin-Inaktivierung durch tierische Gifte analoger Vorgang wird möglicherweise auch durch ein körpereigenes Ferment (Thromboplastinase, Thromboplastinogenase) ausgelöst (FELDMAN, KAP-LAN u. MERANZE; GOLLUB), welches die Phospholipoidkomponente eines

nach CHARGAFF hergestellten Thromboplastinpräparates beeinflußt (FELDMAN u. Mitarb.). Es wäre zu prüfen, ob es sich hier um eine körpereigene Phospholipase A handelt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen, Herrn Dr. KELLAWAY (London) für Naja naja-Gift, der Firma H. Mack Nachf. in Illertissen für die Überlassung von Bienengift.

Zusammenfassung.

Bienengift inaktiviert Hirn- und Lungen-Thromboplastin im wesentlichen durch seinen Gehalt an Phospholipase A; Fraktion I hemmt Thromboplastin erst in wesentlich höheren Konzentrationen und vermag außerdem Fibrinogen zu fällen.

Die Bienengiftwirkung wird durch Citrat, Zinkionen und Jod abgeschwächt, durch Calciumionen unter bestimmten Bedingungen verstärkt; sie ist ähnlich wie bei Schlangengiften relativ stabil gegenüber Erhitzen im Sauren, dagegen bereits bei pH 8 sehr hitzeempfindlich.

Mit Bienen- bzw. Schlangengift versetzte Thromboplastinpräparate entwickeln hämolytische, auf Stoffen der Lysocithingruppe beruhende Aktivität. Gereinigtes Lysocithin aus Eigelb hemmt die Blutgerinnung. Es ist daher z. Zt. noch nicht zu entscheiden, ob bei der Thromboplastin-Inaktivierung eine Zerstörung gerinnungsaktiver Phospholipoide oder das Auftreten von Lysoverbindungen den Ausschlag gibt.

Literatur.

- ABUL-HAJ, S. K., J. WATSON, J. F. RINEHART and E. W. PAGE: Science (Lancaster, Pa.) **114**, 237 (1951). — ASTRUP, T., u. S. DARLING: Acta physiol. scand. (Stockh.) **3**, 168 (1941). — BILLING, W. MCG.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **38**, 173 (1930). — BRAINARD, D.: Rep. Smithson. Inst. Washington 1854, 123; zit. n. BILLING. — CHARGAFF, E.: J. of Biol. Chem. **155**, 387 (1944). — CHARGAFF, E., F. BANCROFT and M. STANLEY-BROWN: J. of Biol. Chem. **116**, 237 (1936). — COHEN, S. S., and E. CHARGAFF: J. of Biol. Chem. **139**, 741 (1941). — COLLIER, H. B.: Federat. Proc. **6**, 245 (1947). — DYCKERHOFF, H., u. R. MARX: Z. exper. Med. **113**, 194 (1944). — EAGLE, H.: J. of Exper. Med. **65**, 613 (1937). — FELDMAN, D., F. E. KAPLAN and D. R. MERANZE: Federat. Proc. **12**, 202 (1953). — FISCHER, A., u. E. HECHT: Biochem. Z. **269**, 115 (1934). — FISCHER, F. G., u. W. P. NEUMANN: Biochem. Z. **324**, 447 (1953). — FLECKENSTEIN, A., u. O. FETTIG: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 415 (1952). — FLECKENSTEIN, A., u. H. GERKHARDT: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 135 (1952). — GOLLUB, S.: Federat. Proc. **12**, 54 (1953). — HABERMANN, E.: unveröffentlicht. — HABERMANN, E., u. W. NEUMANN: Z. physiol. Chem. (im Druck). — HECHT, E.: Sang **21**, 486 (1950). — HECHT, E., u. H. OTTENS: Acta haematol. (Basel) **8**, 265 (1952). — HEIDENSCHILD: Inaug. Diss. Dorpat 1886, zit. nach v. KLOBUSITZKY u. KÖNIG. — HERMANNSDORFER, A.: Biochem. Z. **75**, 1 (1916). — HIRSCHFELD, L., u. R. KLINGER: Biochem. Z. **70**, 398 (1915). — HOUSSAY, B. A.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **105**, 308 (1930). — HOUSSAY, B. A., et A. SORDELLI: J. Physiol. et Path. gén. **18**, 781 (1920), zit. n. Ber. ges. Physiol. **2**, 318 (1920). — KLOBUSITZKY, D. v., u. P. KÖNIG: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 577 (1936). — KRUSE, I., and H. DAM: Biochim. et Biophysica Acta **5**, 268

(1950). — LINK, TH.: Z. Immun.forsch. **92**, 133 (1938). — MELLANBY: J. of Physiol. **38**, 441 (1909), zit. n. LINK. — MILLS, C. A.: J. of Biol. Chem. **46**, 167 (1921). — MORAWITZ, P.: Erg. Physiol. **4**, 307—422 (1905) (S. 407). — MYLON, E., M. C. WINTERNITZ and G. J. DE SÜTÖ-NAGY: J. of Biol. Chem. **143**, 21 (1942). — NEUMANN, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 153 (1954). — NEUMANN, W., u. E. HABERMANN: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 367 (1954) — (2) Z. physiol. Chem. **296**, 166 (1954). — NEUMANN, W., E. HABERMANN u. G. AMEND: Naturwissenschaften **39**, 286 (1952). — NEUMANN, W., E. HABERMANN u. H. HANSEN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 130 (1953). — PELLEGRINI, P., u. G. MODESTI: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **28**, 964, 966 (1952). — SCHULTZE, H. E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 173 (1949). — SEEGER, W. H.: Pharmacol. Rev. **3**, 278 (1951). — TOCANTINS, L. M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **54**, 94 (1943), zit. n. SEEGER. — WOOLDRIDGE, L. C.: Croonian lecture on the coagulation of the blood, London 1893, zit. nach MILLS.

Dr. ERNST HABERMANN, Würzburg, Pharmakolog. Inst. d. Univ.

Aus der Med. Univ.-Klinik, Göttingen (Direktor: Prof. Dr. R. SCHOEN).

Zur Entstehung von Nephrosen durch Plasmapherese am Hund.

Von

HARTWIG CLEVE und FRITZ HARTMANN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Mai 1954.)

Nach der ursprünglichen Auffassung sind die Nephrosen primäre Tubulus-Krankheiten (VOLHARD). In neuerer Zeit hat die Ansicht an Boden gewonnen, daß es sich um eine primäre Dyskrasie handelt, die sekundär zu einer Nierenschädigung führt (LICHTWITZ, WUHRMANN u. WUNDERLY). Für die Entstehung der humoralen Veränderungen wird im wesentlichen die Leber verantwortlich gemacht (OETTEL). Die Auffassung über die Art der zur Nephrose führenden Dyskrasie sind geteilt: Entweder nimmt man eine Dysproteinämie, d. h. eine Verschiebung des Verhältnisses und der Absolutwerte der Serumeiweißfraktionen an, oder man sucht nach abartig zusammengesetzten Serumeiweißen, Paraproteinen, die über die Niere ausgeschieden werden sollen.

Die Vorgänge beim Plasmocytom, die Angaben über immunbiologisch abweichende Eiweißkörper im Serum von Nephrose-Kranken (GOETTSCH u. REEVES), über die abartige Ultraviolett-Absorption solcher Seren (WUHRMANN u. WUNDERLY) oder über veränderte Aminosäure-Zusammensetzung der Serumproteine (BRIGGS) schienen diese Ansicht zu stützen.

Eine Stütze für die Auffassung von der zentralen Bedeutung der Störung der Serumkolloide erhielten diese Theorien durch die Untersuchungen von BARKER und KIRK. Diesen Autoren gelang es, mit langdauernder Plasmapherese Nierenveränderungen, die denen bei Nephrosen ähnlich sahen, zu erzeugen. Daraus wurde geschlossen, daß man durch die im Verlaufe solcher Versuche auftretenden schweren Störungen der Serumkolloide Nephrosen hervorrufen könne. Die Störungen waren gekennzeichnet durch: Hypoproteinämie, Hypalbuminämie, Umkehr des Albumin-Globulin-Quotienten, Zunahme des Blutcholesterins, des Phosphors und Fibrinogens, Absinken von Calcium und Grundumsatz. Neben Ödemen kam es im Urin zur Ausscheidung von Eiweiß, hyalinen und granulierten Cylindern, roten und weißen Blutkörperchen sowie Nierenepithelien. Die histologischen Veränderungen gingen „von leichter trüber Schwellung der Tubuli, Infiltration mit kleinen Rund- und Plasmazellen bis zu deutlichem Tubulus-Untergang, Glomerulus-Atrophie und Hyalinisierung und Kapsel-Verdickung und Ersatz durch Narbengewebe“.

Bei der Wichtigkeit, die den Ergebnissen von BARKER und KIRK, falls sie richtig sind, zuzumessen ist, mußten diese Befunde nachgeprüft werden, da bereits VOLHARD und W. FREY sie zurückhaltend aufgenommen haben.

Methodik.

Es wurden 8 Hunden fortlaufend größere Blutmengen entnommen und die Erythrocyten nach Trennung vom Plasma in Sterofundin aufgeschwemmt reinfundiert. Die Blutentnahme wurde entweder nach dem von LEITER angegebenen Verfahren der wiederholten Herzpunktion, die in Evipan-Kurznarkose ausgeführt wurde, oder durch Punktion der Arteria femoralis vorgenommen. Im Gegensatz zu

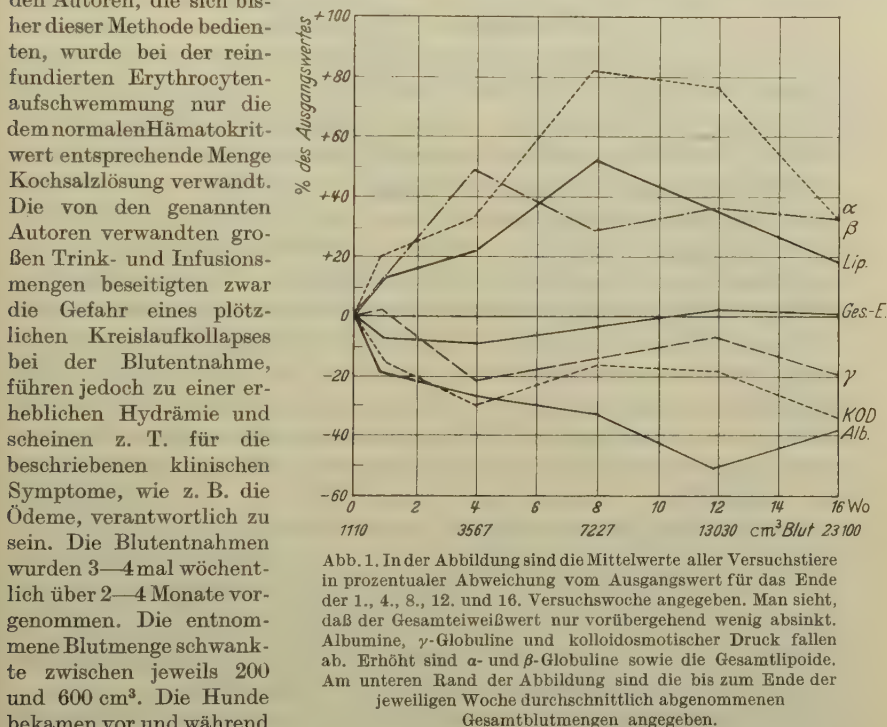


Abb. 1. In der Abbildung sind die Mittelwerte aller Versuchstiere in prozentualer Abweichung vom Ausgangswert für das Ende der 1., 4., 8., 12. und 16. Versuchswoche angegeben. Man sieht, daß der Gesamteiweißwert nur vorübergehend wenig absinkt. Albumine, γ -Globuline und kolloidosmotischer Druck fallen ab. Erhöht sind α - und β -Globuline sowie die Gesamtlipide. Am unteren Rand der Abbildung sind die bis zum Ende der jeweiligen Woche durchschnittlich abgenommenen Gesamtblutmengen angegeben.

Ergebnisse.

Die Veränderungen an Blutlipoiden und Serumeiweißkörpern waren bei allen 8 Versuchstieren qualitativ gleich.

Die Gesamtergebnisse sind als Durchschnittswerte aller Versuchstiere in einem Diagramm wiedergegeben (Abb. 1).

Der Allgemeinbefund der Tiere war immer gut. Sie fraßen befriedigend, nahmen nicht an Gewicht ab. Ödeme wurden nicht beobachtet. Im Urin fand sich niemals Eiweiß, im Sediment waren keine Cylinder, Leukocyten oder Erythrocyten zu sehen.

Im histologischen Befund der Niere (Hämatoxilin-, Eosin- und Sudanfärbung) fanden sich keinerlei Hinweise auf die für Nephrosen typischen Veränderungen an den Glomerulus-Schlingen, der BOWMANSchen Membran und den Tubulus-Epithelien. Am Herzmuskel wurden Veränderungen im Sinne einer Myokardose vermißt. Die Leber war unauffällig.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorliegenden Versuche zeigen eindeutig, daß eine schwere, durch Plasmapherese erzeugte Dysproteinämie allein in einem Zeitraum von 2—3 Monaten am Hunde nicht zu einer Nephrose führt. Weder klinische Zeichen, wie Ödeme noch der typische Urinbefund, noch histologische Veränderungen an den Nieren sprachen für eine Nephrose. Die Art der durch Plasmapherese erzeugten Störung der Blutkolloide ist jedoch in allen Versuchen identisch und ähnelt den Abweichungen, die man auch bei menschlichen Nephrosen zu finden pflegt. Der Gesamteiweißwert bleibt praktisch konstant. Der kolloidosmotische Druck sinkt zwar ab, jedoch nicht so stark, wie es bei menschlichen Nephrosen beobachtet wird. Die Albumine sinken stark ab. Die α -Globuline und β -Globuline steigen in dem gleichen Maße an, ebenso die Gesamt-Serumlipoide. Die γ -Globuline schwanken um den Ausgangswert. Bis auf das Verhalten von Gesamteiweiß und KOD entsprachen die Veränderungen denen bei der menschlichen Nephrose. Die Versuche beweisen also, daß man die für Nephrosen typischen Kolloidstörungen im Blut durch chronischen pararenalen Eiweißentzug erzeugen kann. Der Befund stützt nachhaltig das Argument VOLHARDS, daß man die Serumveränderungen bei den Nephrosen alle zwanglos durch Proteinurie erklären könne. Auch die neueren Versuche von MOENCH über die Masugi-Nephritis rücken die Niere wieder in den Mittelpunkt des Nephrose-Problems.

Allerdings fehlt in den hier vorgelegten Ergebnissen eine Veränderung, die man bei der menschlichen Nephrose häufig, wenn auch nicht immer, vor allem nicht im Anfangsstadium sieht: Das niedrige Gesamteiweiß. Klinisch fehlen die Ödeme. BARKER und KIRK erzeugten diese 2 Symptome mit einer zusätzlichen Hydrämie durch Kochsalzinfusionen. Wir haben mit Absicht auf diese Modifikation verzichtet. Man kann daraus nur den Schluß ziehen, daß sicher nicht die Dysproteinämie allein vom Blut her die zur Nephrose führende Steigerung der Eiweißdurchlässigkeit der Glomerulus-Membran bewirkt. Es bleibt aber die Möglichkeit offen, daß eine starke chronische Hypoonkie, die in unseren Versuchen nicht aufgetreten ist, diesen Schaden setzen kann.

Auf die Regenerationskraft der Proteinbildung führen wir das fehlende Absinken des Gesamteiweißes zurück. Die Ergebnisse zeigen, wie der Kompensationsmechanismus arbeitet und daß er über lange Zeit ausreicht, die beiden wichtigen Größen konstant zu erhalten. Schon aus den Versuchen von LEITER sowie neuerdings GÜLZOW und PICKERT ging hervor, daß sich das Serumeiweiß nach Plasmaentzug schnell erholt. Die Regenerationsgeschwindigkeit der Globuline ist höher als die der Albumine, ein Befund, der soeben durch MAURER mit Hilfe von mit S^{35} markiertem Methionin bestätigt wurde. Danach würden sich die hier vorgelegten Befunde folgendermaßen deuten lassen: Die Regenerationskraft der Albumine reicht nicht aus, um im Laufe der Plasmapherese den Verlust zu decken. Die γ -Globulinsynthese steht mit dem Verlust etwa im Gleichgewicht. Die α - und vor allem β -Globuline steigen an. WUHRMANN hat das als einen Kompensationsmechanismus gedeutet. Für den vorliegenden Fall muß man sich dieser Auffassung anschließen. Es handelt sich um eine hinsichtlich des KOD fast kompensierte Dysproteinämie. Bei den meisten chronischen Dysproteinämien des Menschen, so auch bei der Nephrose versagt der Kompensationsmechanismus auf die Dauer (HARTMANN). In Übereinstimmung mit MACHEBOEF muß dem Anstieg der Gesamtlipide eine Rolle in diesem Mechanismus zuerkannt werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei zum Teil um eine Erhöhung der Lipoproteide des Blutes. Daß unter den Lipoiden vorwiegend die hydrophilen Phosphatide ansteigen, macht den gesamten Mechanismus noch wahrscheinlicher und steht auch in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Lipoidanalyse bei menschlichen Nephrosen (HARTMANN u. SCHULZE).

Zu ähnlichen negativen Ergebnissen über die primäre Bedeutung der Dysproteinämie für die Entstehung der Nephrosen kam KÜCHMEISTER. Er fand lediglich, daß Plasmapherese-Hunde im MASUGI-Versuch eine Nephrose entwickeln und deutet dieses Geschehen als Unterfunktion der Nebennierenrinde.

Über das Auftreten von Paraproteinen bei der Plasmapherese geben die vorliegenden Untersuchungen keinen Aufschluß. Es kann also nicht gesagt werden, ob abartige Eiweißkörper zur Nephrose führen können, wenn die Nieren es versuchen sollten, den Körper von ihnen zu befreien. Daß bei Plasmapherese Paraproteine gebildet werden, ist unwahrscheinlich, denn die Untersuchungen von ROSE u. WHIPPLE über die essentiellen Aminosäuren haben gezeigt, daß der Organismus entweder normale — oder wenn diese Aminosäuren nicht mehr zur Verfügung stehen — gar keine Serumeiweißkörper bildet. Eigene Untersuchungen über die Aminosäurezusammensetzung der Serumeiweißkörper bei Nephrosen haben gezeigt, daß der Organismus sich auch in diesem Falle an den physiologischen Bauplan der Proteinsynthese hält (HARTMANN).

Das Verhältnis der Proteine zur Lipoidkomponente ist unter krankhaften Bedingungen nicht konstant (KUNKEL). Man mag sich streiten, ob man sie dann als

Paraproteine bezeichnen soll. Besser wäre die Bezeichnung Paralipoproteide. Für die Erkenntnis der Bedeutung solcher möglichen qualitativen Veränderungen der Lipoproteide für die Pathogenesen der Nephrosen sind die neuen Untersuchungen von CAVELTI wesentlich. Er zeigte, daß die Variationen des Lipoidanteils bei künstlichen und Glomerulus-Membranen keinen Einfluß auf die Durchwanderungsgröße des Eiweißanteils haben. Auch im Ultrafiltrat von Nephroseserum erscheint nicht mehr Eiweiß als bei Verwendung von Normalseren. Er schließt daraus, daß Voraussetzung für die Eiweißausscheidung in der Niere eine Schädigung der Glomerulus-Membran ist.

Zusammenfassung.

1. Über 2—4 Monate an 8 Hunden durchgeführte Plasmapherese-Untersuchungen ergeben folgendes Verhalten der Serumkolloide: Das Gesamteiweiß bleibt praktisch konstant. Der kolloidosmotische Druck sinkt nur gering ab. Die Albumine fallen stark ab. Die α -Globuline und vor allem die β -Globuline sind entsprechend erhöht. Bei den Gesamtlipoiden steigen vor allem die Phosphatide an. Die γ -Globuline schwanken um den Mittelwert.

2. Trotz der Erzeugung der für Nephrosen typischen Blutveränderungen fehlten die klinischen und histologischen Zeichen einer Nephrose.

3. Aus den Ergebnissen wird ablehnend zu der Auffassung Stellung genommen, daß es sich bei den Nephrosen um primäre Störungen der Blutkolloide im Sinne von Dys- oder Paraproteinämien handelt, die erst sekundär zu den nephrotischen Nierenveränderungen führen sollen.

Literatur.

- BARKER, H., and P. KIRK: Arch. Int. Med. **45**, 319 (1930). — BRIGGS, A. P.: J. of Biol. Chem. **104**, 231 (1934). — CAVELTI, R.: Helvet. med. Acta **16**, 51 (1934). — FREY, W.: Handb. Inn. Med. VIII (1951). — GOETTSCH, E., and E. B. REEVES: J. Clin. Invest. **15**, 173 (1936). — GÜLZOW, M., u. H. PICKERT: Z. exper. Med. **115**, 40 (1949). — HARTMANN, F.: Helvet. med. Acta **19**, 97 (1952). — HARTMANN, F., u. G. SCHULZE: Verh. dtsh. Ges. inn. Med. **58**, 300 (1952). — HARTMANN, F.: Verh. dtsh. Ges. inn. Med. **59**, 457 (1953). — KÜCHMEISTER, H.: Tagung Nordwestdtsh. Ges. inn. Med., Kiel (1953). — KUNKEL, H.: J. Clin. Invest. **31**, 677 (1952). — LEITER, L.: Arch. Int. Med. **48**, 1 (1931). — LICHTWITZ, P.: Die Praxis der Nierenkrankheiten. 3. Aufl. 231 (1934). — MACHEBOEF, A. C.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **192**, 1413 (1931). — MOENCH, A., C. ROTHER, H. J. SARRE u. H. SARTORIUS: Verh. dtsh. Ges. inn. Med. **59**, 458 (1953). — NIKLAS, A., u. W. MAURER: Naturwissenschaften **39**, 260 (1952). — OETTEL, H.: Erg. inn. Med. **64/2**, 754 (1936). — VOLHARD, FR.: Handb. Inn. Med. 2. Aufl. VI/2, 98 (1931). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Bull. schweiz. Akad. Med. Wiss. **6**, 254 (1950). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. 2. Aufl., 320 (1952).

Dozent Dr. F. HARTMANN, Göttingen, Med. Univ.-Klinik.

Aus dem Pharmakologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN)
und dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
(Vorstand: Prof. Dr. med. CURT SONNENSCHNIG) der Universität Würzburg.

Zur morphologischen Differenzierung der Hämolyse durch Bienengift, Schlangengift, Lysocithin und Digitonin.

Von

ERNST HABERMANN und ELISABETH MÖLBERT.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. März 1954.)

Die Gifte von Bienen und Schlangen stören die Funktion nahezu aller daraufhin untersuchten Systeme des tierischen Organismus tiefgreifend; gleichzeitig sind in bestimmten Fällen bei geeigneter Dosierung auch Strukturänderungen von Zellen oder Zellbestandteilen erkennbar. Die lange bekannte hämolytische Wirkung der Gifte ist ein experimentell gut zugänglicher Sonderfall dieser wohl generellen Eigenschaft. Nun besagt aber der Begriff „Hämolyse“ nur, daß die Zellmembran auf irgendeine Weise hämoglobindurchlässig wird. Über die zugrunde liegenden Strukturveränderungen ist damit nichts ausgesagt. Wir haben uns daher zunächst die Frage gestellt, ob und in welcher Weise das morphologische Bild der sogenannten Membranschatten der Erythrocyten von Mensch und Frosch durch die Gifte verändert wird. Zum Vergleich bzw. zur näheren Erfassung des Wirkungsmechanismus haben wir analoge Versuche mit der aus Bienengift gewonnenen direkt hämolysierenden Fraktion I (NEUMANN u. HABERMANN, HABERMANN [1], F. G. FISCHER u. W. P. NEUMANN) ausgeführt, ebenso mit Lysocithin und Digitonin.

Methodik.

Für die Versuche mit Menschenblutkörperchen wurden 4 Teile Venenblut eines gesunden, 27jährigen Spenders mit einem Teil 3,8% iger Natriumcitratlösung vermischt und zentrifugiert, der Bodensatz dreimal mit 0,85% iger Kochsalzlösung gewaschen. Die Erythrocyten wurden dann in Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (p_H 7,0), welcher mit 4 Teilen Kochsalzlösung verdünnt war, zu einer (aus dem Hämatokritwert berechneten) 0,6% igen Suspension aufgeschwemmt. Davon wurden jeweils 9 ml mit 1 ml Hämolytikum versetzt. Zur Hämolyse wurden die Ansätze mit Bienengift und seiner Fraktion I, ebenso mit Lysocithin und Digitonin 40 min, die mit Gift von *Naia nigricollis* versetzten wegen des anderen zeitlichen Verlaufs der Hämolyse 2 Std bei 37° gehalten. Als Kontrolle wurden 3 ml 1,8% iger Erythrocytensuspension mit 7 ml Aqua bidest. 40 min bei 37° gehalten. In diesem hypotonischen Milieu blieb die Hämolyse noch unvollständig, doch erfolgte totale Hämolyse bei anschließendem Zentrifugieren und Waschen des Niederschlages mit Wasser.

Nach der Behandlung mit Gift bzw. Wasser wurden sämtliche Ansätze sofort 20 min bei 12000 g und etwa $10-15^\circ$ zentrifugiert (Pirouette). Die hohe Tourenzahl war zur Gewinnung feiner Membranbestandteile erforderlich. Das Sediment wurde noch zweimal nachgewaschen, bei Gifthämolyse mit Puffer, bei Hypotoniehämolyse mit Wasser. Anschließend wurde mit 1% igem gepuffertem Osmiumtetroxyd fixiert. Um Einflüsse des Zentrifugierens zu erkennen, wurden in den meisten Fällen auch Präparate aus unzentrifugierten Ansätzen mit OsO_4 fixiert.

Die morphologischen Veränderungen wurden mikroskopisch im Hell- und Dunkelfeld und mit Phasenkontrast und außerdem elektronenoptisch zur Darstellung gebracht. Die Ansätze wurden vor und nach dem Zentrifugieren und nach der Osmiumfixierung dunkelfeldmikroskopisch untersucht. Es fanden sich dabei (mit Ausnahme der mit Lycocithin behandelten Froscherythrocyten, siehe unten) keine prinzipiellen Unterschiede zwischen nicht zentrifugierten und zentrifugierten Ansätzen. Bei der ersten Waschung wurde aus partiell hämolysierten Ansätzen noch Blutfarbstoff ausgewaschen. Bei giftfreien Kontrollansätzen in isotonischem Milieu war dies nicht der Fall. Die bei der Hypotoniehämolyse entstandenen Schatten tendierten nach der ersten Waschung zur Agglutination. Zusatz von 10% Pufferlösung zur Waschflüssigkeit setzte diese Agglutinationsneigung herab. Die Osmiumfixation war stets ohne Einfluß auf das lichtmikroskopische Bild; die mit Digitonin hämolysierten Erythrocyten flockten nach Zugabe des Fixationsmittels leicht aus, wurden aber im Vergleich zu unfixierten Kontrollen elektronenoptisch nicht wesentlich verändert.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung (MÖLBERT) wurden nach der Osmium-Fixation die Niederschläge zweimal mit Aqua bidest. gewaschen, auf mit Kollodiumfolien beschickte elektronenmikroskopische Objektträger aufgetragen und nach Trocknung im Hochvakuum mit Palladium schrägbedampft. Die so erhaltenen Präparate wurden in einem elektrostatischen AEG-Zeiss-Elektronenmikroskop bei einer Strahlspannung von 50 KV untersucht.

Verwendete Substanzen. Fraktion I von Bienengift: chromatographisch von F. G. FISCHER und W. P. NEUMANN aus Bienenpikratgift (Jahrgang 1951) gewonnen und von uns (HABERMANN) pharmakologisch auf Reinheit geprüft. Bienenpikratgift (Jahrgang 1951): von der Firma H. Mack Nachf., Illertissen, freundlichst überlassen. — Lycocithin: nach MAGISTRIS hergestellt, amorph, leicht wasserlöslich. — Digitonin: Digitoninum crist. „Merck“.

1. Hämolyse durch Bienengift und dessen Fraktion I.

a) *Versuche mit menschlichen Erythrocyten.* Schon früher (HABERMANN [3]) fiel auf, daß nach Einwirkung einer hohen Bienengift- oder Fraktion I-Konzentration die Erythrocytenschatten besonders leicht zentrifugierbar waren, also ein erhöhtes spezifisches Gewicht aufwiesen. Licht- und elektronenoptisch wurden Ansätze mit Bienengift- oder Fraktion I-Konzentrationen von 1:10000, 1:40000, 1:100000 und 1:1000000 untersucht. Bei Annahme eines Molekulargewichts von etwa 30000 (F. G. FISCHER u. W. P. NEUMANN) für Fraktion I ergab sich für diese eine Konzentration von m/300000, m/1200000, m/3000000 oder m/30000000.

Bienengift- oder Fraktion I-Verdünnungen 1:10000 führten zu gleichartigen morphologischen Veränderungen. Bereits im Hellfeld erkannte man die Erythrocytenreste als stark lichtbrechende, rundliche

Gebilde von unregelmäßigem Umriß, mit dem Phasenkontrastverfahren und noch besser im Dunkelfeld fanden wir weitere Einzelheiten: die Erythrocyten waren im Vergleich zu den als Kontrolle dienenden Hypotonieschatten stark geschrumpft ($\varnothing$ 3—4 μ) und brachen das Licht viel stärker; eine Agglutination fand nicht statt. Die Oberfläche der „Schatten“ erschien rau und grobkörnig. Dunkelfeldaufnahmen, welche diese Verhältnisse illustrieren, finden sich bei NEUMANN.

Elektronenoptisch ergab sich ein tieferer Einblick in die veränderte Membranstruktur (Abb. 1). Im Vergleich zu der verwaschenen, äußerst

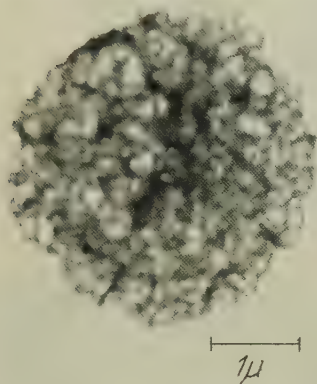


Abb. 1. Menschlicher Erythrocyt, mit Bienengift-Fraktion I 1:10000 hämolysiert. 12000:1 (1938/53).

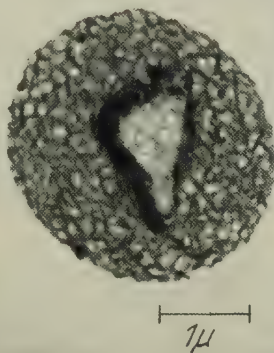


Abb. 2. Stroma eines durch Hypotonie hämolysierten Erythrocyten, der nach dreimaliger Waschung mit Wasser in eine Bienengiftlösung 1:10000 gebracht wurde. 12000:1 (1059/53).

feinkörnigen Granulierung der Kontrollschatten fand sich hier ein gänzlich anderes Bild: man konnte kaum mehr von einem Schatten sprechen, und auch die Bezeichnung „Membran“ traf nicht mehr zu. Der Erythrocyt war in ein lockeres, grobmaschiges, unregelmäßiges Netzwerk aus verschiedenen dicken Filamenten umgewandelt. Die Zwischenräume zwischen den einzelnen Strängen waren elektronenoptisch leer, wie man es auch an den Randstrukturen des Erythrocyten erkennen kann. Teilweise waren die Maschen verklumpt und zeigten mehr körnige Struktur. Erythrocyten, welche vor der Fixation nicht zentrifugiert worden waren, boten das gleiche Bild. Die Veränderungen ließen sich auch an gewaschenen, durch Hypotoniehämolyse gewonnenen Schatten nachträglich durch Bienengift hervorrufen. Allerdings riß bei dieser Versuchsanordnung regelmäßig die Membran an einer Stelle ein (Abb. 2).

Aus diesen Bildern ging jedoch noch nicht hervor, ob das Netzwerk nur auf die Oberfläche des Erythrocyten beschränkt ist oder ob es auch das Erythrocyteninnere durchzieht. Es wurden daher die bei der Hämolyse

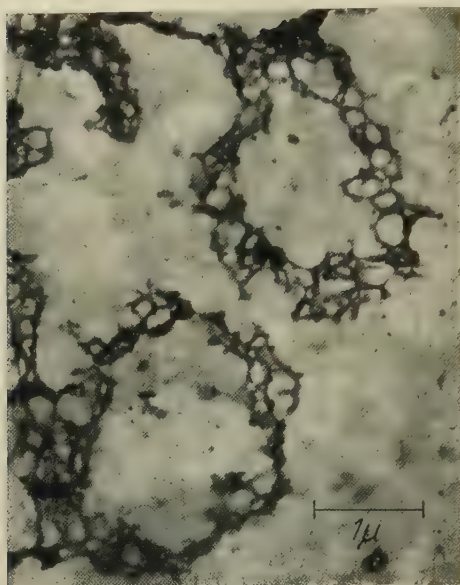


Abb. 3. Schnitt durch mit Bienenpikratgift 1:10 000 hämolysierte, in Esterwax eingebettete Erythrocyten. 14 000:1 (850/53).

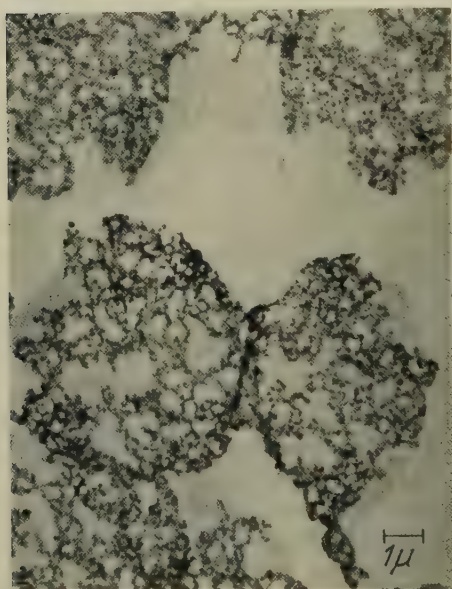


Abb. 4. Stromata von mit Bienenpikratgift 1:40 000 hämolysierten Erythrocyten. 4600:1. Man beachte die rund dreimal geringere Vergrößerung im Vergleich zu Abb. 1—3 (1822/53).

durch Bienengift 1:10 000 erhaltenen Schatten nach OsO_4 -Fixation und Durchführung durch die aufsteigende Alkoholreihe in Esterwax eingebettet und mit dem Ultramikrotom Modell HE der R. Jung AG. geschnitten. Wie Abb. 3 zeigt, ist das wabenartige Netzwerk auf die Membran der Erythrocyten beschränkt; in keinem Falle konnte es im Innern nachgewiesen werden.

Bei der Bienengift- bzw. Fraktion I-Konzentration 1:40 000 erhielten wir elektronenoptisch ein eigenartiges Bild (Abb. 4). Die Membran hatte sich in ein weitmaschiges Netzwerk verwandelt, auf dessen Strängen dichte, undurchstrahlbare Körnchen aufgereiht waren (Hämoglobinrest?). Der Durchmesser der Stromata war nicht wesentlich verkleinert. Im Dunkelfeld nahmen sie eine Mittelstellung zwischen den mit Bienengift 1:10 000 und 1:100 000 behandelten Zellen ein. Erythrocyten, welche bereits vor dem Zentrifugieren fixiert worden waren, zeigten prinzipiell gleichartige Veränderungen; nur waren die Stränge des Netzes breiter und verwaschener.

Auch die Bienengift- bzw. Fraktion I-Konzentration 1:100 000 erzeugte noch deutliche Membranveränderungen. Im Hellfeld und Phasen-

kontrastbild unterschieden sich die Schatten zwar nicht von denen der Hypotoniehämolyse, im Dunkelfeld erkannte man jedoch ein deutlich stärkeres Lichtbrechungsvermögen. Elektronenoptisch war die Erythrocytenmembran mit Flecken geringerer Durchstrahlbarkeit besetzt

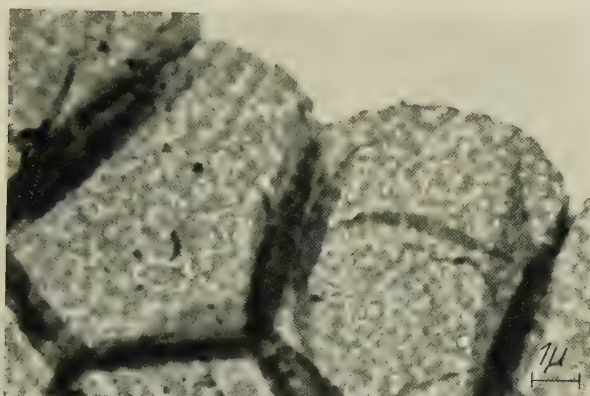


Abb. 5. Stomata von mit Fraktion I 1:100000 hämolysierten Erythrocyten. 6000:1 (1809/53).

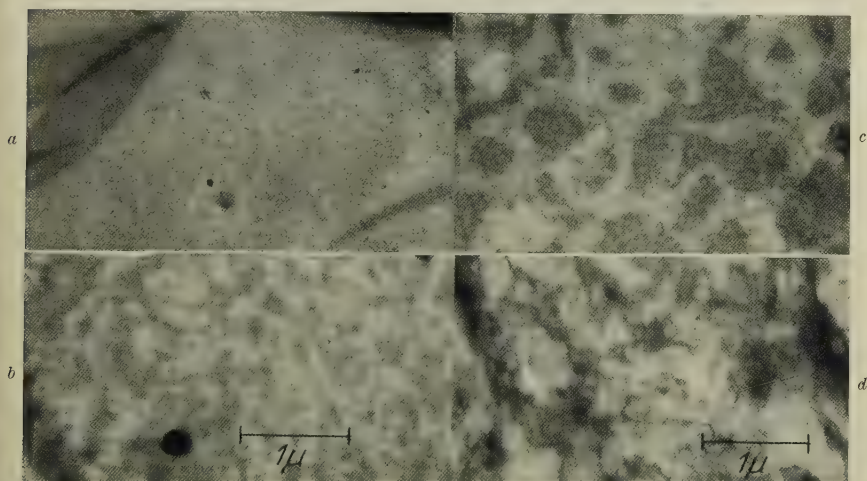


Abb. 6. Vergleich der Feinstruktur von mit Wasser (a), Bienengift 1:100000 (b, d) und Fraktion I 1:100000 (c) hämolysierten Erythrocyten. 14000:1 (827, 1063, 1411, 1064/53).

(Abb. 5); bei den mit Bienengift behandelten Zellen hatte man gelegentlich den Eindruck, als würden sich feine Schüppchen oder Bläschen von der Oberfläche abheben (Abb. 6, spez. d).

In Verdünnung 1:1000000 führte nur noch Bienengift zur totalen Hämolyse, während Fraktion I erwartungsgemäß (HABERMANN [3]) nur noch partiell hämolysierte. An den mit Bienengift bzw. Fraktion I

hämolysierten Erythrocyten waren lichtoptisch keine eindeutigen morphologischen Veränderungen gegenüber den Kontrollschatten nachweisbar. Elektronenoptisch zeigten die Membranen der mit Bienengift behandelten Erythrocyten eine feine Granulierung, welche etwas gröber zu sein schien als die der Kontrollschatten. In den mit Fraktion I behandelten Ansätzen waren zahlreiche unhämolyzierte Stechapfelformen zu finden, daneben Stromata mit ähnlicher Textur wie die mit Bienengift behandelten.

Die eben beschriebenen Strukturveränderungen sind stark temperaturabhängig. Sie treten bereits binnen wenigen Minuten ein, wenn man

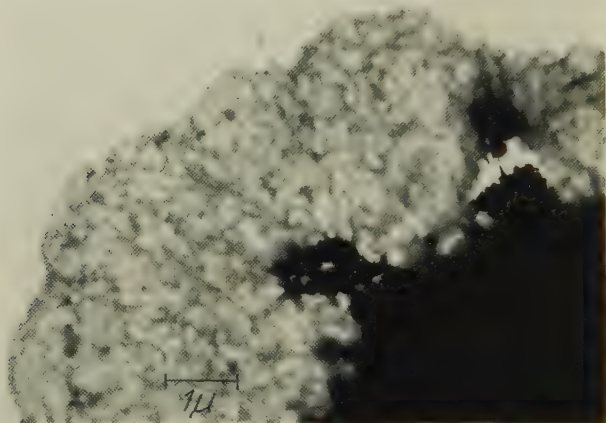


Abb. 7. Froscherythrocyt, mit Bienepikratgift 1:10000 hämolyziert. 9600:1 (700/53).

menschliche Erythrocyten mit Bienengift 1:10000 auf die übliche Weise bei 37° behandelt. Hält man die Blutkörperchen dagegen bei Zimmertemperatur (21°), so ist auch nach 12 Std die Umwandlung noch nicht bis zu dem sonst beobachteten Ausmaß fortgeschritten.

b) *Versuche mit Frosch-Erythrocythen.* Nun war noch zu prüfen, wie Bienengift auf kernhaltige Erythrocyten einwirkt. Froscherythrocyten (*Rana temp.*) wurden unter gleichen Bedingungen wie menschliche Erythrocyten gewaschen, mit Bienengift 1:10000 behandelt und anschließend 5 min auf einer gewöhnlichen Zentrifuge bei 3000 U/min zentrifugiert. Während es nicht gelang, die mit Wasser hämolyzierten Erythrocyten des Kontrollversuchs hämoglobinfrei zu erhalten, waren die mit Bienengift behandelten nahezu farblos und sehr stark lichtbrechend. Im Cytoplasma erkannte man dunkelfeld- und phasenkontrastmikroskopisch eine radiäre Struktur. Elektronenoptisch fanden sich im Vergleich zu den gequollenen Zellen und Zellkernen der Wasserhämolyse stark konturierte, fadenförmige Plasmastrukturen, welche mit Kern und Zellmembran in Kontakt standen. Besonders interessant erschienen Kernaussläufer, wie sie auf Abb. 7 zu erkennen sind.

2. Hämolyse durch Schlangengift.

Nur ein kleiner Teil der von uns untersuchten Schlangengifte wirkt im untersuchten p_H -, Konzentrations- und Zeitbereich *direkt* hämolytisch. Als am weitaus aktivsten erwies sich bisher das Gift der *Naia nigricollis*, welches wir daher für die hier geschilderten Versuche verwandten.

Der Ablauf der Hämolyse durch Nigricollisgift unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der durch Bienengift (HABERMANN [3]). Die Endkonzentrationen waren 1:2000, 1:20000, 1:200000, 1:2000000, die Inkubationsdauer betrug wegen des anderen zeitlichen Ablaufs 2 Std. Die Gewinnung und Fixierung der Schatten erfolgte wie bei Bienengift.

Die bei Giftkonzentrationen 1:2000 und 1:20000 erhaltenen Erythrocytenschatten zeigten bereits im Dunkelfeld einige Besonderheiten gegenüber der Kontrolle. Ihr Durchmesser war mit etwa 6μ etwas kleiner als der von Kontrollschatten, jedoch erheblich größer als der von mit Bienengift bzw. Fraktion I 1:10000 behandelten Erythrocyten. Die Membranen waren etwas starrer und brachen auch das Licht stärker als die Kontrollen, nahmen also auch in dieser Hinsicht eine Mittelstellung zwischen Bienengift- und Hypotoniehämolyse ein. Diese Veränderungen waren im Dunkelfeld bei 1:2000 deutlich, bei 1:20000 nur noch angedeutet. Bei Verdünnungen von 1:200000 war zwar komplette Hämolyse eingetreten, die Schatten unterschieden sich jedoch nicht wesentlich von den mit Aqua dest. erhaltenen. Sie neigten stark zur Verklumpung.

Elektronenoptisch (Abb. 8) ergaben sich weitere Einzelheiten. Ähnlich wie bei der Hämolyse durch Bienengift 1:10000, aber in weitaus schwächerem Ausmaß, hatten sich bei der Giftkonzentration 1:2000 in der Membran netzartige Strukturen gebildet, deren Maschen verschieden weit waren. Das Netzwerk war leicht gefältelt und stellenweise ausgestülpt, so daß man an kleinzipflige Stechapfelformen erinnert wurde. Außerdem fiel an manchen Erythrocyten eine kontrastreiche Körnelung auf (Abb. 8a).

Bei der Verdünnung 1:20000 zeigten sich elektronenoptisch stärkere Veränderungen, als sie nach den lichtmikroskopischen Beobachtungen zu erwarten gewesen wären. Zum Teil fanden sich Erythrocytenschatten, welche den mit Nigricollisgift 1:2000 hämolysierten ähnelten, aber ein viel größeres Netzwerk aufwiesen; zum Teil schienen sich von der Oberfläche zahlreiche Bläschen abzuschnüren, deren Durchmesser zwischen $0,1$ und $0,7\mu$ schwankte (Abb. 8b).

Bei der Konzentration 1:200000 besaß die Grundtextur noch immer weitgehende Unterschiede gegenüber den Hypotoniehämolysen. Die Membranen waren fein granuliert. Die Membranfalten waren um so deutlicher zu erkennen, je geringer die Giftkonzentration war (Abb. 8c).

Nigricollisgift 1:2000000 erzeugte ein polymorphes Bild. Die meisten Erythrocyten zeigten eine kleinzipflige Stechapfelform. Teilweise be-

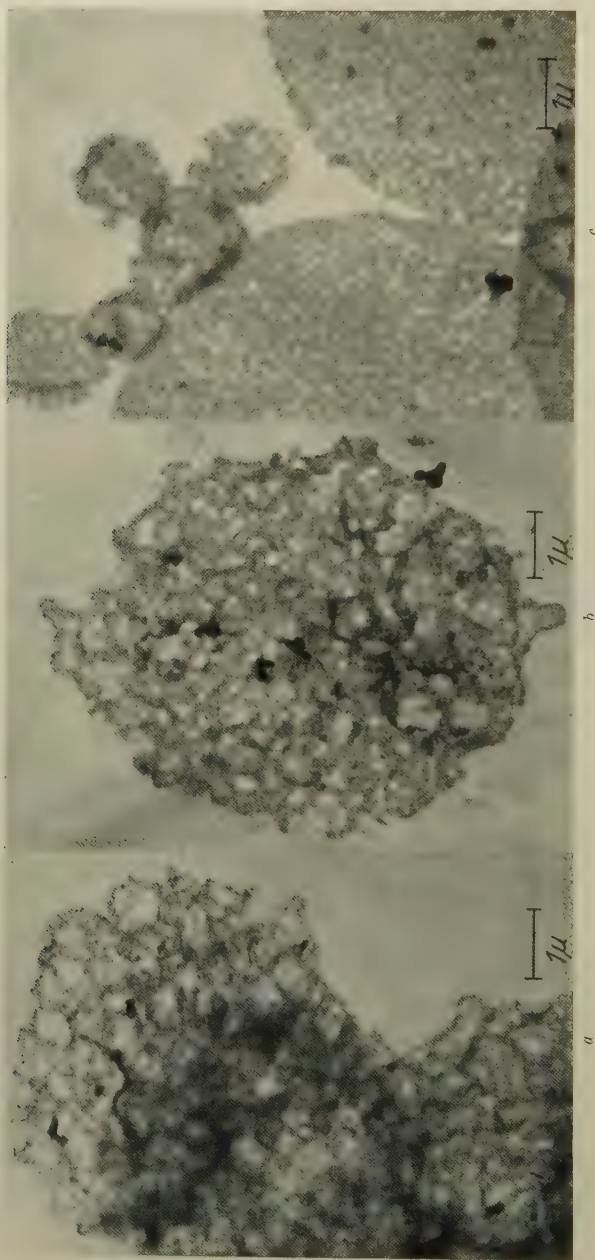


Abb. 8. Stromata von mit Nigricollisgift 1:2000 (a), 1:20000 (b) und 1:200000 (c) hämolysierten Erythrocyten. 8500:1 (1291, 1298, 1309/53).

obachteten wir ovale bis annähernd kreisrunde Gebilde, die etwa 1 bis $2\ \mu$ groß und sehr dicht waren. Ob sie durch Zerfall oder Abschnürung entstanden waren, ist unklar. Vor der Fixation nicht zentrifugierte Zellen waren elektronenoptisch prinzipiell gleichartig verändert; zusätzlich fanden sich bei Verdünnungen 1:2000 und 1:20000 Auflagerungen auf dem Maschenwerk, und auch die Räume zwischen den Maschen waren weniger gut durchstrahlbar im Vergleich zu den vor der Fixation gewaschenen Schatten.

3. Hämolyse durch *Lysocithin* und *Digitonin*.

Lysocithin, das aus Lecithin unter Einwirkung der im Bienen- und Schlangengift enthaltenen Phospholipase A entsteht (vgl. NEUMANN u. HABERMANN; NEUMANN, HABERMANN u. HANSEN), ist früher als Ursache der hämolytischen Wirkung des Bienengifts angesehen worden. In Wirklichkeit unterscheidet sich aber Lysocithin in seiner hämolytischen Wirkung eindeutig vom Bienengift. Das direkt hämolytische Agens im Bienengift ist dessen elektrophoretische Fraktion I (NEUMANN u. HABERMANN). Phospholipase A ist offenbar unfähig, das Lecithin intakter Erythrocyten anzugreifen, wie schon von ROY betont wurde, aber Phospholipide von gewaschenen Erythrocytenstromata können durch Schlangengift in Lysoverbindungen übergeführt werden. So überlagern sich bei Bienengift und bestimmten Schlangengiften die Wirkungen eines direkt hämolysierenden Prinzips mit denen der indirekt hämolysierenden Phospholipase A.

Aus den oben angeführten Untersuchungen geht bereits hervor, daß Phospholipase A an den durch Bienengift hervorgerufenen morphologischen Veränderungen der Erythrocyten nicht wesentlich beteiligt ist; denn die von uns verwendete Fraktion I enthielt weniger als 0,5% des Gehalts an Phospholipase A im gereinigten Bienengift, führte aber trotzdem, wie wir elektronenoptisch kontrollierten, zu prinzipiell gleichen Erythrocytenveränderungen.

Das für unsere Hämolysestudien benutzte *Lysocithin* wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie unserer Universität nach MAGISTRIS aus mit Bienengift bebrütetem Eigelb gewonnen. Wir ließen es in Verdünnungen 1:10000 bis 1:1000000 auf eine 0,6% ige Suspension menschlicher Erythrocyten maximal 40 min bei 37° einwirken und hielten im übrigen die oben genannten Bedingungen ein. Zu unserer Überraschung verschwanden die Schatten menschlicher Erythrocyten bei Behandlung mit Lysocithin 1:10000 und 1:20000 lichtoptisch bereits binnen weniger Minuten; wir haben es also hier tatsächlich mit einer *Hämo-Lysis im wörtlichen Sinne dieser Bezeichnung* zu tun. Es ist dies sicher kein Effekt des Zentrifugierens oder Fixierens; denn bereits in dem unzentrifugierten Ansatz sind die Schatten nicht mehr aufzufinden. Elektronenoptisch wurden ebenfalls keine Membranen

gefunden, die Aufnahmen zeigten nur noch morphologisch nicht einzuordnende Schlieren.

Bei Lysocithinverdünnungen 1:40000 und 1:80000 ließen sich im Dunkelfeld geschrumpfte Membranen nachweisen, welche das Licht stärker als die hypotonisch hämolysierten Erythrocyten brachen. Im Elektronenmikroskop beobachtete man bei der Konzentration 1:40000 Stromata, welche aus einem grobmaschigen Netz bestanden, dem kontrastreiche Teilchen aufgelagert waren. Daneben kamen auch mehr wolkige

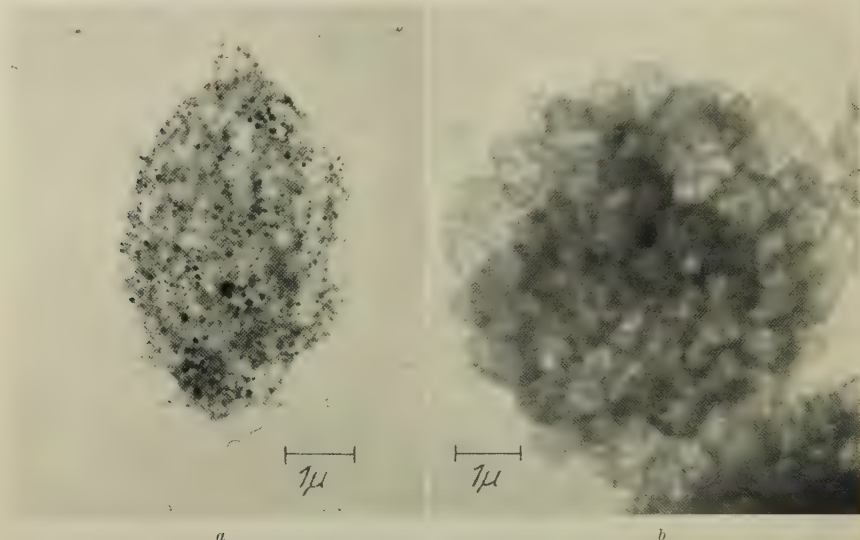


Abb. 9. Stromata von mit Lysocithin behandelten Erythrocyten.
(a) Lysocithin 1:40000. 9500:1. (b) Lysocithin 1:80000. 9500:1 (1816 1817/53).

Formen vor, insbesondere bei der Konzentration 1:80000 (Abb. 9). In ohne vorheriges Zentrifugieren fixierten Ansätzen waren die Veränderungen grundsätzlich gleich.

Bei der Verdünnung 1:100000 konnten lediglich im Elektronenmikroskop Veränderungen erkannt werden. Die Textur des Erythrocytenschattens war gegenüber der feinen Zeichnung bei der Hypotoniehämolysen deutlich vergrößert.

Am *Froscherythrocyten* führte Lysocithin zu sehr ähnlichen Veränderungen. Während Bienengift neben Hämolysen gleichzeitig Erstarrung und verschärfte Zeichnung der Membranen und der Plasmastrukturen hervorrief, fanden wir nach einstündiger Inkubation mit Lysocithin 1:10000 bei 37° vor dem Zentrifugieren äußerst zarte, flottierende Schatten; im Dunkelfeld waren Zellmembran und -kern nur eben noch erkennbar. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei 3000 U/min) waren diese

Gebilde nicht wieder aufzufinden, statt dessen schwammen vereinzelt Kerne in verschiedenen Stadien des Zerfalls neben amorphem Detritus durchs Gesichtsfeld. Lysocithin vermag also bei kernhaltigen Erythrocyten nicht nur die Zellmembranen, sondern auch die Zellkerne so zu verändern, daß sie bereits gegen sehr geringe mechanische Einflüsse labil werden.

Lysocithin vermag aber nicht nur normale Zellstrukturen anzugreifen. Auch mit *Bienengift* 1:10000 vorbehandelte, stark geschrumpfte menschliche *Erythrocytenmembranen* werden, wenn auch langsam, durch *Lysocithin* 1:10000 aufgelöst.

In der Literatur wird immer wieder eine saponinartige Wirkung von Bienengift (FLURY) diskutiert. Um zu klären, ob morphologische Beziehungen zwischen Bienengift- und Saponinhämolyse bestehen, wurden Versuchsreihen mit *Digitonin* („Merck“) 1:10000 bzw. 1:40000 durchgeführt. Bei der anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchung erschienen die Schatten bei beiden Konzentrationen starr, wie mit feinem Zucker und einzelnen größeren Körnern überzogen, aber nicht wesentlich geschrumpft.

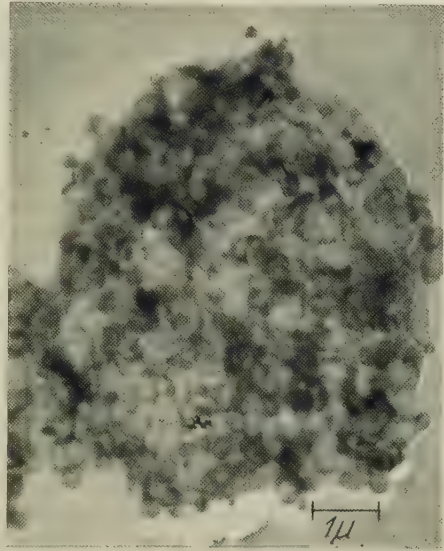


Abb. 10. Erythrocyt, mit *Digitonin* 1:10000 hämolysiert. 8500:1 (831/53).

Elektronenoptisch zeigte sich bei der Konzentration 1:10000 das bereits von JUNG u. BÖHM beschriebene Bild einer sehr starken *Schuppenbildung* (Abb. 10). *Digitonin*konzentrationen 1:40000 ergaben, sowohl in vor der Fixation zentrifugierten als auch in un zentrifugierten Ansätzen, stark deformierte Erythrocyten mit breiten Ausläufern, deren Membrantextur gegenüber den Kontrollen deutlich vergrößert war.

Besprechung.

Aus den angeführten, vor allem aus den elektronenoptischen Beobachtungen ergibt sich, daß die hier untersuchten Hämolytica am Erythrocyten in ganz verschiedener Weise angreifen.

Die Hämolyse durch Bienengift bzw. dessen direkt hämolysierende Fraktion I einerseits und durch Lysocithin andererseits erzeugt grundsätzlich verschiedene morphologische Veränderungen. Lysocithin führt

in höheren Konzentrationen zur echten „Lyse“ der Stromata. Bienengift und die daraus gewonnene Fraktion I dagegen verursachen eine netzartige Veränderung, Verdickung und Schrumpfung der Struktur der Erythrocytenmembran. Damit erledigen sich alle früheren Versuche, die Bienengifthämolyse durch intermediäre Lysocithinbildung zu erklären.

Die durch Bienengift eintretenden Veränderungen könnte man auf zweierlei Art deuten. Einerseits wäre denkbar, daß die direkt hämolyisierende Komponente des Giftes (— Fraktion I, Melittin) direkt an das Erythrocytenstroma gebunden wird, daß also die Strukturveränderung mit der Anreicherung hämolsysierender Substanz an der Membran zusammenhängt. Es erscheint jedoch wenig wahrscheinlich, daß die Zunahme der optischen und gewichtsmäßigen Dichte der resultierenden Schatten lediglich auf Adsorption von Bienengiftbestandteilen beruht. Viel einfacher erklärt sie sich durch eine unter teilweiser Aufhebung der Kontinuität erfolgende Schrumpfung der Erythrocytenmembran.

Für die Deutung der biochemischen Vorgänge, die der morphologischen Veränderung zugrunde liegen, besteht eine Reihe von Anhaltspunkten. Bienengift bzw. das daraus isolierte, stark basische, direkt hämolytische Prinzip (Fraktion I, Melittin) vermag mit verschiedenen hochmolekularen Substanzen, deren isoelektrischer Punkt im Sauren liegt, Bindungen einzugehen, z. B. mit Eigelblecithin, Heparin, Thrombozid, Hyaluronsäure (HABERMANN [1]); die Hitzekoagulation verdünnter Eigelbemulsion wird durch Fraktion I begünstigt. Nun liegt auch der isoelektrische Punkt des Erythrocyten bzw. des Erythrocytenschattens (vgl. PONDER) sehr weit im Sauren. Möglicherweise werden also die Strukturveränderungen des Erythrocyten durch eine Säure-Basen-Reaktion an seiner Oberfläche ausgelöst.

Vom Lysocithin dagegen ist bekannt (GROSSE u. TAUBÖCK), daß es Cholesterinsuspensionen zu klären vermag, daß es also als Lösungsvermittler für Cholesterin und wahrscheinlich auch für verwandte Substanzen fungiert, von denen mindestens Cholesterinester am Aufbau des Erythrocyten beteiligt sind. Auch mit Lecithin tritt Lysocithin in Reaktion (HABERMANN [3]). Man könnte also aus der anscheinend totalen Lysocithin-Lyse der Erythrocyten schließen, daß die Lipide der Membran für deren Zusammenhalt von entscheidender Bedeutung sind; denn andere Angriffspunkte des Lysocithins sind bisher nicht bekannt. Da durch Lysocithin auch Schatten aufgelöst wurden, die durch Bienengifthämolyse erhalten wurden, so ist weiter zu schließen, daß in diesen Schatten noch Lipide enthalten sind, die sich einerseits mit Lysocithin umsetzen, andererseits für den Zusammenhalt der Membranstruktur wesentlich sind.

Die bei Schlangengifthämolyse (Gift von *Naia nigricollis*) zurückbleibenden Stromata zeigen gewisse Ähnlichkeiten mit den durch Bienengift oder dessen Fraktion I dargestellten. Hier wie dort findet sich eine

Verdichtung und Neigung zur Netzbildung, wenn diese auch bei Bienengift erheblich stärker ausgeprägt ist. Bei Schlüssen auf die Natur des zugrunde liegenden Hämolysemechanismus ist aber Vorsicht geboten, da das Gift von *Naia nigricollis* von wesentlich komplizierterer Natur ist als Bienengift; das *direkt* hämolytische Prinzip liegt auch in diesem Falle in einer oder mehreren stark basischen Komponenten, aber sicher nicht in der Phospholipase A (HABERMANN [3]).

Die untersuchten Hämolytica Bienengift, Nigricollisgift, Lysocithin und Digitonin führen nach unseren Befunden zu untereinander recht verschiedenen morphologischen Bildern. Auch mit den bei anderen Hämolysearten (vgl. JUNG) beschriebenen Veränderungen stimmen diese nicht überein. Sichere Beziehungen zur Oberflächenaktivität der Hämolytica lassen sich ebenfalls nicht herstellen; denn Lysocithin, Fraktion I (HABERMANN [2]) und Digitonin erniedrigen alle die Oberflächenspannung von Wasser stark, aber jede dieser drei Substanzen verändert die Erythrocytenmembran auf andere Weise; Nigricollisgift besitzt nur geringe Oberflächenwirksamkeit (HABERMANN [3]), alteriert aber dennoch die Erythrocytenmembran sehr stark.

Inwieweit die beobachteten elektronenoptischen Veränderungen (z. B. im extremen Fall der „Lyse“ durch Lysocithin und „Netzbildung“ durch Bienengift) die eigentliche Ursache des Hämoglobinaustritts darstellen, oder ob hier sekundäre Umwandlungen bereits ihres Farbstoffs lediger Erythrocyten vorliegen, ist schwer zu entscheiden. Es ist zu bedenken, daß in eben noch total hämolsierenden Grenzkonzentrationen nur geringe Vergrößerungen der Membranstruktur gefunden wurden, welche viele Deutungen zulassen, zumal die Präparationstechnik das Bild beeinflussen kann. Digitonin (JUNG u. BÖHM) führt nicht wie Lysocithin (eigene Versuche) zur Stromatolyse, vielleicht tun dies aber einige andere Saponine (PLATTNER u. HINTNER). Aufgabe weiterer Untersuchungen wird es sein, Beziehungen zwischen Morphologie und Kinetik der Hämolyse sowie Parallelen zwischen chemisch und funktionell ähnlichen Hämolytica aufzufinden, nicht zuletzt auch die hier gewonnenen Ansätze für ein näheres Studium der Struktur der Erythrocytenmembran zu verfolgen.

Zusammenfassung.

Die Veränderungen von Erythrocyten unter dem Einfluß von Bienengift, dessen Fraktion I, Lysocithin und Schlangengift werden licht- und elektronenoptisch untersucht und mit den durch Hypotonie und Digitonin erzeugten verglichen.

Bienengift sowie die daraus gewonnene Fraktion I führt bei Konzentrationen von 1:10000 zu starker, bei 1:40000 zu schwächerer Schrumpfung und netzartiger Strukturierung des Schattens. Kernhaltige Erythrocyten (Frosch) werden in analoger Weise verändert. Schnitte durch

Erythrocyten nach Behandlung mit Bienengift 1:10000 zeigen, daß das Netz auf die Wand des Erythrocyten beschränkt ist. Bei einer Konzentration von 1:100000 treten fleckförmige Verdickungen des Erythrocytenstromas auf. Lysocithin 1:10000 und 1:20000 löst die Erythrocytenschatten auf, 1:40000 und 1:80000 führt zu Schrumpfung und partieller Stromatolyse, 1:160000 ergibt keine eindeutigen Veränderungen. Am Froscherythrocyten vermindert Lysocithin 1:10000 auch die Stabilität des Zellkerns.

Naia nigricollis-Gift erzeugt ebenfalls in Konzentrationen 1:2000 und 1:20000 Verdickungen und netzartige Strukturierung des Erythrocytenschattens, aber nur unbedeutende Schrumpfung der Membran.

Zusammenhänge zwischen Morphologie und Mechanismus der genannten Hämolysen werden besprochen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die uns auch die Benutzung eines Elektronenmikroskops ermöglichte, danken wir für Sachbeihilfen.

Literatur.

FISCHER, F. G., u. W. P. NEUMANN: *Biochem. Z.* **324**, 447 (1953). — FLURY, F.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **85**, 319 (1920). — GROSSE, A., u. K. TAUBÖCK: *Z. Rheumaforsch.* **5**, 429 (1942). — HABERMANN, E. (1): *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **218**, 108 (1953). — HABERMANN, E. (2): *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **222**, 173 (1954). — HABERMANN, E. (3): unveröffentlicht. — JUNG, F.: *Naturwissenschaften* **37**, 229, 254 (1950). — JUNG, F., u. K. BÖHM: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **207**, 144 (1949). — MAGISTRIS, H.: *Biochem. Z.* **210**, 85 (1929). — NEUMANN, W.: *Naturwissenschaften* **41**, 322 (1954). — NEUMANN, W., u. E. HABERMANN: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **222**, 387 (1954). — NEUMANN, W., E. HABERMANN u. H. HANSEN: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **217**, 130 (1953). — PLATTNER, F., u. H. HINTNER: *Arch. f. Physiol.* **224**, 293 (1930). — PONDER, E.: *Discuss. Faraday Soc.* **6**, 152 (1949). — ROY, A. C.: *Nature (Lond.)* **155**, 696 (1945).

Dr. ERNST HABERMANN, Würzburg, Pharmacol. Institut. d. Univ.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

Untersuchungen über die Wasserbindung in organischen Systemen.

III. Die Gefrierpunkte überlebender Warmblütergewebe.

Von

J. PICHOTKA W. HÖFLER und J. REISSNER *.

(Eingegangen am 22. April 1954.)

Es gibt in der physiologischen Literatur eine außerordentlich große Anzahl von Untersuchungen über den osmotischen Druck des Blutes der verschiedenen Tierarten. Wie in keiner anderen Frage herrscht in den Ergebnissen völlige Übereinstimmung. Der osmotische Druck des Blutes ist in großen Bereichen der Tierwelt gleich. Er liegt z. B. für die Säugtiere — als Gefrierpunktserniedrigung ausgedrückt — mit geringen Abweichungen um $-0,58^{\circ}$. Dieser Wert ist für eine Species und für ein Individuum unter den verschiedensten Umständen von einer erstaunlichen Konstanz. Die extremsten Belastungen vermögen ihn nur wenig zu beeinflussen^{5, 11, 29}. Die nach schwerer muskulärer Leistung beobachteten geringen Änderungen sind in kurzer Zeit wieder ausgeglichen¹². Nur bei einem Teil der im Meere lebenden Tiere ist eine anhaltende Beeinflussung der osmotischen Spannung des Blutes bekanntgeworden, und zwar durch Änderung der Salzkonzentration ihrer Umgebung^{2, 4, 26}.

Im Gegensatz dazu gibt es nur sehr wenige Arbeiten, die die osmotische Spannung des Wassers in den Geweben mit direkten Methoden zu bestimmen versuchten. Diese Untersuchungen kamen zudem in bezug auf die beobachteten Werte zu wenig übereinstimmenden Resultaten. Immerhin findet sich in ihnen die gemeinsame Feststellung, daß die Gefrierpunktserniedrigung von Gewebsstücken, Gewebsbrei und Preßsaft von Geweben größer ist als die des zugehörigen Blutes^{3, 25, 30}.

So fand URANO³⁰ eine Gefrierpunktserniedrigung des Preßsaftes von Froschmuskeln von $-0,62^{\circ}$, während die des zugehörigen Blutes etwa $-0,43^{\circ}$ beträgt^{7, 8, 13, 30}. SABBATANI²⁵ beobachtete Gefrierpunkte von Stücken verschiedener Gewebe des Hundes zwischen $-0,64^{\circ}$ und $-1,06^{\circ}$. In Messungen an Gewebsbreien fand COLLIP³ für Herzmuskel, Milz und Lunge Gefrierpunkte von $-0,74^{\circ}$ bis $-0,87^{\circ}$.

Diese Untersuchungen fanden keine Fortsetzung, sondern gerieten in Vergessenheit. Das lag zum einen daran, daß ihre Ergebnisse in schärfstem Widerspruch standen zu der allgemein anerkannten Hypothese von der osmotischen Isotonie innerhalb der Organismen. Entscheidend aber war

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Tier Nr.	Leber		Niere		Herz		Zwerchfell		Bauchmuskul		Psoas		Oberschenkel		Milz	
	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std
7	-0,93°	0	-1,09°	30	-1,02°	48					-1,02°	26				
	-1,09°	2½	-1,08°	45							-1,12°	28				
	-1,45°	5														
8			-0,96°	6	-0,90°	0					-0,82°	8				
			-0,93°	7												
9	-1,51°	0	-1,12°	21	-0,84°	48					-1,08°	26				
	-1,43°	3	-1,12°	21½	-0,84°	50					-1,08°	27				
	-1,43°	4½														
	-1,37°	6														
	-1,60°	7														
10	-1,14°	0	-0,89°	12	-0,95°	26					-1,06°	5				
	-1,41°	24	-0,98°	29	-0,91°	27										
Mittel- wert	-1,33° ± 0,04°		-1,03° ± 0,03°		-0,93° ± 0,03°		-1,21° ± 0,07°				-0,99° ± 0,04°		-0,99° ± 0,05°			
Minimum	-0,93°		-0,89°		-0,83°		-1,00°				-0,76°		-0,92			
Maximum	-1,67°		-1,12°		-1,10°		-1,38°				-1,03°		-1,03			
Mittelwert für alle Muskelmessungen -0,99° ± 0,03°																

das Fehlen einer zuverlässigen Methode der Gefrierpunktsbestimmung unter Vermeidung von Unterkühlungen.

In einer vorausgehenden Untersuchung haben wir ein Verfahren zur exakten Gefrierpunktsbestimmung in organischen Systemen angegeben²⁰. Mit Hilfe dieser Methode ist in der folgenden Untersuchung eine größere Anzahl von Messungen an den Organen verschiedener Tierarten durchgeführt worden.

Methodik.

Die Bestimmung des Gefrierpunktes wurde in gleicher Weise durchgeführt wie die bereits ausführlich beschriebene thermische Analyse von Geweben²⁰. Die Messung wurde aber zumeist abgebrochen, nachdem sich nach erfolgreicher Impfung eine konstante Temperatur eingestellt hatte, aus deren Verlauf die Realität des Gefrierpunktes zu schließen war. Durch fortlaufende Impfung bei langsamer Abkühlung konnte auch in einer Einzelmessung ein genauer Wert für den Gefrierpunkt erreicht werden. Wenn der Gefrierpunkt des betreffenden Gewebes bereits ungefähr bekannt war, zogen wir es im allgemeinen vor, eine Unterkühlung von etwa $0,2^\circ$ eintreten zu lassen. Der dadurch eintretende Konzentrationsfehler ist auch im ungünstigsten Fall im Rahmen dieser Untersuchung zu vernachlässigen. Demgegenüber steht der Vorteil, daß infolge der höheren Kristallisationsgeschwindigkeit bei niedrigerer Temperatur eine schnelle und sichere Einstellung auf den Gefrierpunkt erfolgt. Die Realität der so gemessenen Gefrierpunkte ließ sich in jedem Fall aus dem Temperaturverlauf während der weiteren Abkühlung nachweisen.

Die Messungen beziehen sich auf Organe von 10 Kaninchen, 12 Meerschweinchen, 6 Ratten und 4 Katzen. Mit Ausnahme der Katzen wurden alle Tiere unmittelbar zu diesen Messungen durch Dekapitation getötet. Die Katzen stammten aus anderen Versuchen und starben in Narkose. Die Messungen erfolgten in der Zeit von unmittelbar nach dem Todeseintritt bis zu 50 Std später. Der Großteil der Messungen erfolgte während des ersten Tages, bei Ratten und Meerschweinchen fast ausschließlich innerhalb dieser Spanne. Das gesamte Tier wurde während dieser Zeit im Kühlschrank aufbewahrt und die Gewebestücke jeweils unmittelbar zur Messung entnommen.

Für eine Messung wurden 4–6 g Gewebe benutzt, und zwar von Leber, Niere, Milz, Herz und Muskulatur der verschiedensten Herkunft. Die genaue Beschreibung des Meßverfahrens findet sich in der vorhergehenden Veröffentlichung²⁰.

Die statistische Prüfung erfolgte nach der *t*-Verteilung von STUDENT²⁷. Die Resultate sind in *P*-(probability)-Werten angegeben. $P = 0,01$ bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von 1%, usw. Der Üblichkeit halber ist die mittlere Abweichung des Mittelwertes mit angegeben. Sie spielt aber für die hier angewandte statistische Methode keine Rolle.

Ergebnisse.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden etwa 220 Messungen durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse ist in den folgenden Tabellen zusammengefaßt, und zwar handelt es sich hier nur um die Tiere, von denen mehrere Organe zur Messung dienten.

In der Tab. 1 sind die Ergebnisse aus 80 Messungen an Kaninchenorganen dargestellt. Der Mittelwert der Gefrierpunktserniedrigung aus allen Messungen ohne Unterscheidung beträgt $\Delta = -1,12^\circ \pm 0,03^\circ$, mithin etwa das Doppelte des nach der Literatur gültigen Wertes für die

Gefrierpunktserniedrigung des Kaninchenserums. Die Aufgliederung der Ergebnisse nach Tieren und Organen und nach der Überlebenszeit zeigt jedoch, daß das Material nicht homogen ist, sondern daß sich charakteristisch unterschiedene Werte herauschälen.

Die für ein bestimmtes Tier an einem Organdurchgeführten Messungen weisen insbesondere bei der Leber erhebliche Unterschiede auf. Diese Differenzen können jedoch nicht im üblichen Sinn als Streuung in bezug auf die hier durchgeführte Messung aufgefaßt werden. Unmittelbar hintereinander durchgeführte Kontrollmessungen am gleichen Material ergaben immer praktisch gleiche Resultate. Eine Streuung von seiten des Meßverfahrens liegt diesen Differenzen also im wesentlichen nicht zugrunde. Die hier beobachteten unterschiedlichen Einzelwerte müssen jeweils für eine bestimmte Gewebeprobe zu einer bestimmten Zeit als real angesehen werden. Eine Erklärung für das wechselnde Verhalten des Gefrierpunktes ist noch nicht möglich. (Vgl. unten S. 224f.)

Tabelle 2. Vergleich der Gefrierpunktmittelwerte von Kaninchenorganen.

	Oberschenkel — 0,99° ± 0,03°	Zwerchfell — 1,21° ± 0,07°	Niere — 1,03° ± 0,03°	Herz — 0,93° ± 0,03°	Psoas — 0,99° ± 0,04°
Leber	<u>3,366</u>	1,393	<u>4,816</u>	<u>6,883</u>	<u>5,917</u>
— 1,33°					
± 0,04°	(3,646)	(3,646)	(3,592)	(3,551)	(3,551)
Psoas	0,00	<u>3,5</u>	0,949	1,43	
— 0,99°					
± 0,04°		(3,922)	(3,767)	(3,725)	
Herz	1,213	<u>5,04</u>	2,788		
— 0,93°					
± 0,03°	(4,073)	(3,965)	(3,792)		
Niere	0,937	<u>3,314</u>			
— 1,03°					
± 0,03°	(4,221)	(4,073)			
Zwerchfell	2,83				
— 1,21°					
± 0,07°	(5,041)				
Oberschenkel. . .					
— 0,99°					
± 0,03°					

t-Werte für den Vergleich der Gefrierpunkte verschiedener Kaninchenorgane: Der eingeklammerte Wert ist der *t*-Wert für $P = 0,001$. Für doppelt unterstrichene Werte $P \leq 0,001$, für einfach unterstrichene Werte $P \leq 0,01$.

Wie aus der Tab. 1 hervorgeht, sind die Gefrierpunkte für die verschiedenen Gewebe nicht gleich, sondern es finden sich charakteristische Differenzen. In der Tab. 2 ist die statistische Realität der Unterschiede

zwischen den verschiedenen Organgeweben dargestellt. Als Grenzwert für die Signifikanz eines Unterschiedes ist im allgemeinen $P = 0,001$ angesehen. Unterschiede, die bis dicht an diesen Wert heranrücken, werden selbstverständlich auch als real betrachtet. Nach dieser Darlegung ergeben sich auf Grund unserer Messungen gesicherte Unterschiede in den Gefrierpunkten zwischen der Leber und allen anderen verglichenen Geweben des Kaninchens mit Ausnahme des Zwerchfells. Weiterhin bestehen sichere Unterschiede zwischen den Gefrierpunkten von Zwerchfellmuskulatur einerseits und der Muskulatur des Herzens und des Musculus psoas andererseits. Die Sicherung der Differenz für eine ganze Reihe weiterer Vergleiche ist nach den vorliegenden Ergebnissen lediglich eine Frage des Aufwandes.

In den Tab. 3, 4 und 5 sind die unter gleichen Bedingungen gemessenen Gefrierpunktserniedrigungen an Organen von Meerschweinchen, Ratten und Katzen dargestellt. Die wenigen Messungen an Ratten und Katzen sind nur aufgeführt, um zu zeigen, daß die zu erwartenden Werte bei diesen beiden Species in der gleichen Größenordnung liegen wie bei Meerschweinchen und Kaninchen. Ebenso wie beim Kaninchen sind beim Meerschweinchen die Mittelwerte des Gefrierpunktes für Leber und Muskelgewebe signifikant verschieden ($P < 0,001$). Der Vergleich der Gruppen untereinander bringt zum Vorschein, daß die Mittelwerte über alle Messungen beim Meerschweinchen ($-1,12^\circ \pm 0,02^\circ$) und beim Kaninchen ($-1,12^\circ \pm 0,03^\circ$) nicht verschieden sind. Die Zusammensetzung dieses Gesamtmittels bei den beiden Tierarten ist aber deutlich verschieden. Beim Kaninchen liegt der Durchschnittswert für das Lebergewebe ($-1,33^\circ \pm 0,04^\circ$) hoch über den Durchschnittswerten für die anderen Gewebe und über dem Gesamtmittel ($-1,12^\circ \pm 0,03^\circ$). Beim Meerschweinchen sind die Differenzen zwischen den einzelnen Geweben viel weniger ausgeprägt und der Mittelwert für die Leber ($-1,19^\circ \pm 0,03^\circ$) liegt wenig über dem Gesamtdurchschnitt ($-1,12^\circ \pm 0,02^\circ$). Ein Vergleich der Werte für die Gefrierpunktserniedrigung des gleichen Organ Gewebes bei den verschiedenen untersuchten Tierarten findet sich in Tab. 6. Daraus ergibt sich, daß in unseren Messungen die Gefrierpunktswerte für die Leber in den drei untersuchten Species signifikant verschieden sind. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Messungen an der Rattenleber alle unmittelbar nach der Tötung durchgeführt wurden, und daß die mittlere Überlebenszeit der Meerschweinchenorgane geringer ist als die der Kaninchenorgane. Eine Verschiebung der drei verglichenen Werte wäre bei gleicher Überlebensdauer des Lebergewebes möglich, obwohl sie nach den vorliegenden Meßwerten unwahrscheinlich ist. Es ist weiterhin bemerkenswert, daß die Mittelwerte für das Muskelgewebe verschiedener Herkunft bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen nicht verschieden sind. Weiterhin ist der mittlere

Tabelle 3.

Gefrierpunktserniedrigungen von Meerschweinchenorganen in Grad. Der Mittelwert für sämtliche Messungen beträgt $-1,12^\circ \pm 0,02^\circ$. Die Mittelwerte für Leber und Muskelgewebe sind signifikant verschieden ($P < 0,001$).

Durch Klammern zusammengefaßte Werte stellen Doppelmessungen an derselben Gewebsprobe dar. Die 2. Messung ist unmittelbar nach dem Tauen durchgeführt.

Tier Nr.	Leber		Niere		Bauchmuskel		Oberschenkel		Psoas	
	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std	°C	Std
1	$-0,95^\circ$	0	$-1,13^\circ$	19			$-1,00^\circ$	26		
	$-0,97^\circ$	1	$-1,09^\circ$	20			$-1,20^\circ$	31		
	$-1,17^\circ$	1								
2	$-0,99^\circ$	0	$-1,05^\circ$	5	$-0,94^\circ$	24				
	$-1,20^\circ$	3			$-1,12^\circ$	26				
	$-1,17^\circ$	6								
3	$-1,13^\circ$	0	$-1,20^\circ$	29	$-0,99^\circ$	5	$-1,02^\circ$	34	$-1,04^\circ$	28
	$-1,40^\circ$	1			$-1,09^\circ$	7	$-1,01^\circ$	35		
4	$-1,30^\circ$	0								
	$-1,23^\circ$	$1\frac{1}{2}$	$-1,15^\circ$	4	$-0,94^\circ$	7				
	$-1,34^\circ$	25								
	$-1,35^\circ$	$25\frac{1}{2}$								
5	$-1,20^\circ$	31	$-1,03^\circ$	7	$-0,82^\circ$	0	$-1,13^\circ$	$4\frac{1}{2}$		
	$-1,39^\circ$	$31\frac{1}{2}$			$-0,99^\circ$	3	$-1,04^\circ$	$5\frac{1}{2}$		
							$-0,94^\circ$	$7\frac{1}{2}$		
6	$-1,20^\circ$	0								
7	$-1,22^\circ$	0								
8	$-1,27^\circ$	0								
9	$-1,17^\circ$	0								
	$-1,08^\circ$	1								
10	$-1,45^\circ$	0								
	$-1,27^\circ$	1								
11	$-1,13^\circ$	0								
12	$-1,02^\circ$	0								
	$-1,04^\circ$	1								
Mittelwert	$-1,19^\circ \pm 0,03^\circ$		$-1,11^\circ \pm 0,03^\circ$		für alle Messungen am Muskelgewebe:			$-1,02^\circ \pm 0,02^\circ$		
Minimum	$-0,95^\circ$		$-1,03^\circ$					$-0,82^\circ$		
Maximum	$-1,45^\circ$		$-1,20^\circ$					$-1,20^\circ$		

Tabelle 4. Gefrierpunktserniedrigungen von Rattenorganen in Grad.
(Der Mittelwert für alle Messungen beträgt $0,99^\circ \pm 0,03^\circ$.)

Tier Nr.	Leber	Bauchmuskel	Oberschenkel
1	— 0,86° 0 Std	— 0,84° 2 Std	— 1,02°
2	— 1,08° 0 „	— 1,02° 3 „ — 1,15° 4½ „	„
3	— 1,06° 0 „	— 1,06° 3 „	„
4	— 1,13° 0 „	— 1,01° 1 „	„
5	— 0,87° 0 „	— 1,06° 1 „ — 0,97° 3 „	„
6	— 0,91° 0 „	— 0,84° 2 „	„
Mittelwert	— 0,98° $\pm$ 0,04°	— 0,99° $\pm$ 0,04°	
Minimum	— 0,86°	— 0,84°	
Maximum	— 1,13°	— 1,15°	

Tabelle 5. Gefrierpunktserniedrigungen bei Katzen in Grad.

Tier Nr.	Leber	Gehirn
1	— 1,17°	
2	— 1,46°	— 0,74°
3	— 1,23°	
4		— 0,87°

Gefrierpunkt des Nierengewebes bei Kaninchen und Meerschweinchen signifikant verschieden.

Eine exakte Feststellung über die Größe der Differenzen zwischen den verschiedenen Geweben der gleichen Species und den gleichen Geweben verschiedener Species wäre nur mit Hilfe der Variationsanalyse

unter Berücksichtigung der Überlebenszeit möglich. Bei der Kompliziertheit der hier vorliegenden Verhältnisse ist die Zahl der Messungen für eine solche Behandlung noch zu gering. Insbesondere ist der Gang der Veränderungen mit der Überlebensdauer durchaus noch nicht klar, wie im folgenden noch ausführlich erörtert wird. Es ist aber anzunehmen, daß die Ergebnisse auch nach Berücksichtigung dieser Bedingungen sich nicht wesentlich ändern werden.

Änderung der Gefrierpunktserniedrigung mit der Überlebensdauer der Gewebe.

Wie aus den Tab. 1 und 3 ersichtlich ist, bleiben die Gefrierpunktserniedrigungen eines bestimmten Organes nicht konstant, sondern erfahren mit zunehmender Überlebensdauer charakteristische und zum Teil erhebliche Veränderungen. Nach dem ersten Eindruck nimmt die Größe der Gefrierpunktserniedrigung in den meisten Fällen mit der Dauer der Überlebenszeit zu. Die genauere Analyse zeigt jedoch, daß das Verhalten erheblich komplizierter ist.

In 28 Messungen an verschiedenen Geweben von Kaninchen und Meerschweinchen, die unmittelbar nach dem Tode der Tiere durchgeführt wurden, fand sich eine mittlere Gefrierpunktserniedrigung von $-1,08^\circ \pm 0,04^\circ$. Dieser Wert ist kaum verschieden von dem Mittelwert für alle Messungen mit Überlebensdauern bis zu 50 Std ($-1,12^\circ \pm 0,03^\circ$). Daraus ergibt sich als erstes, daß Gefrierpunktserniedrigungen dieser Größenordnung ohne wesentliche Überlebensdauer der Gewebe zur Beobachtung kommen. Die Zeit von der Tötung des Tieres bis zur Abkühlung des präparierten Gewebes auf 0° überschritt in diesen Messungen nicht die 20 min-Grenze.

Tabelle 6.

		Meerschweinchen			Ratten		
		Leber $-1,19^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	Niere $-1,11^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	Muskel $-1,02^\circ$ $\pm 0,02^\circ$	Leber $-0,98^\circ$ $\pm 0,04^\circ$	Niere	Muskel $-0,99^\circ$ $\pm 0,04^\circ$
Kanin- chen	Leber $-1,33^\circ$ $\pm 0,04^\circ$	<u>2,913</u> (3,496)	—	—	<u>4,121</u> (3,646)	—	—
	Niere $-1,03^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	—	<u>4,188</u> (4,073)	—	—	—	—
	Muskel $-0,99^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	—	—	0,934 (3,592)	—	—	0,00
Meer- schwein- chen	Leber $-1,19^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	—	—	—	3,538 (3,707)	—	—
	Niere $-1,11^\circ$ $\pm 0,03^\circ$	—	—	—	—	—	—
	Muskel $-1,02^\circ$ $\pm 0,02^\circ$	—	—	—	—	—	0,716 (4,221)

t-Werte für den Vergleich gleicher Organe bei den verschiedenen Species. Der Wert in Klammern ist der *t*-Wert für $P = 0,001$. Doppelt unterstrichene Werte haben eine signifikante Differenz mit $P \leq 0,001$, einfach unterstrichene mit $P \leq 0,01$.

Ein Anhalt für die Komplexität der unterliegenden Verhältnisse läßt sich aus den Ergebnissen der Messungen am Lebergewebe gewinnen. Aus 52 Messungen an Lebern von Meerschweinchen und Kaninchen in der Zeit von der Tötung bis mehr als 30 Std später ergab sich ein Mittelwert von $-1,27^\circ \pm 0,03^\circ$. Die 16 Messungen, die unmittelbar im Anschluß an die Tötung durchgeführt wurden, ergaben einen Mittelwert

von $-1,17^\circ \pm 0,04^\circ$. Diese letztere Gruppe ist aber statistisch signifikant uneinheitlich. Sie läßt sich in 2 Gruppen hoher und niedriger Werte auflösen ($P < 0,001$). Diese Tatsache ist wichtig, weil diese beiden Gruppen einen verschiedenen Gang der Änderung der Gefrierpunktserniedrigung mit der Überlebensdauer aufweisen. Bei den niedrigen Erstwerten steigt in den folgenden Messungen die Gefrierpunktserniedrigung ohne Ausnahme unmittelbar an. Die Wiederholung einer Messung — d. h. die zweite Gefrierung einer Gewebprobe — führt dabei erfahrungsgemäß zu einer der Richtung nach gleichen Änderung wie ein Altern des betreffenden Gewebes. In den Fällen mit den stärksten Gefrierpunktserniedrigungen in den Erstmessungen unmittelbar nach der Tötung der Tiere findet sich in den nachfolgenden Messungen zunächst ein Abfall der Gefrierpunktserniedrigungen und erst in später gelegenen Messungen ein Anstieg. Ein Beispiel für dieses Verhalten ist das Tier Nr. 9 in Tab. 1.

Trotz der geringen Zahl von Messungen, die für diese Frage bisher zur Verfügung stehen, ist diese Beobachtung mit hoher Wahrscheinlichkeit real. In sechs Fällen wurde innerhalb einer Überlebensdauer von 24 Std ein sicherer Abfall der Gefrierpunktserniedrigung des Lebergewebes beobachtet. Diese sechs Messungen fanden sich 1. ausschließlich bei den Tieren mit den höchsten beobachteten Ausgangswerten unmittelbar nach der Tötung (Mittelwert $-1,36^\circ$) und 2. nur innerhalb eines Abstandes von 1—6 Std nach der Tötung. Die Zuordnung des Abfalls der Gefrierpunktserniedrigung mit zunehmender Überlebensdauer zu den höchsten Ausgangswerten ist in unseren Messungen signifikant mit $P < 0,001$. Entscheidend für das Ziel dieser Untersuchung ist die Feststellung, daß in einem Teil der Fälle in der ersten Phase des Überlebens ein gesicherter Abfall der Gefrierpunktserniedrigung zur Beobachtung kommt. Für die Realität dieser Beobachtung kann man nach dem vorausgehenden ebenfalls eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0,001$ annehmen.

Tabelle 7. *Änderung des Gefrierpunktes von Lebergewebe mit der Überlebensdauer.*

	1.	2.	3.	4.	5.
Zeit	0	1—3 Std	4—6 Std	6—9 Std	25—30 Std
Zahl der Beobachtungen . .	16	8	6	3	7
Mittelwert . . .	$-1,17^\circ$	$-1,30^\circ$	$-1,36^\circ$	$-1,45^\circ$	$-1,44^\circ$

Differenz von 1. gegen 4. und 5. signifikant mit $P < 0,001$.

Den durchschnittlichen Anstieg der Gefrierpunktserniedrigung für das Lebergewebe von Meerschweinchen und Kaninchen zeigt die Tab. 7. Die Zunahme der Mittelwerte von $-1,17$ unmittelbar nach dem Tode auf

—1,44 nach 6—24 Std ist mit $P < 0.001$ signifikant. Mit Überlebenszeiten von mehr als 30 Std findet sich eine deutliche Zunahme der niedrigen Werte sowohl bei der Leber als bei den anderen Organen. Die Zahl der Beobachtungen an der Leber in dieser Periode ist zu gering, um den Abfall in Mittelwerten darstellen zu können. Nach der Verteilung der niedrigen Werte insgesamt kann aber kein Zweifel darüber bestehen, daß mit längerer Überlebensdauer die Gefrierpunktserniedrigungen wieder geringer werden, ohne daß es möglich ist, ein einfaches statistisches Maß dafür anzugeben.

Zusammengefaßt läßt sich feststellen: Die beobachteten Veränderungen des Gefrierpunktes mit zunehmender Überlebensdauer müssen die komplexe Summe mehrerer unabhängiger Prozesse darstellen. Es lassen sich zumindest zwei unabhängige Bewegungen aus den gemessenen Werten wahrscheinlich machen. Die höchsten beobachteten Werte in den Messungen unmittelbar nach Tötung des Tieres fallen in der ersten Phase der Überlebensdauer mit hoher Wahrscheinlichkeit zunächst ab ($P < 0.001$), um dann im weiteren Verlauf anzusteigen. Die niedrigen Ausgangswerte steigen mit hoher Wahrscheinlichkeit sofort an ($P < 0.001$). Der Unterschied im Verhalten dieser beiden Gruppen kann rein quantitativer Natur sein. Es können in beiden Gruppen dieselben Prozesse ablaufen, deren relatives Maß in Abhängigkeit von den Ausgangswerten verschieden ist. Nach längerer Überlebensdauer kommt es schließlich wieder zum Abfall der Gefrierpunktserniedrigungen, ohne daß ein Verlust an gelösten Substanzen möglich wäre.

Zusammenfassung und Besprechung.

In einer voraufgehenden Untersuchung²⁰ wurde festgestellt, daß der Gefrierpunkt nur in Lösungen ein umfassendes Maß der Wasserbindung darstellt. In komplizierten und geordneten Systemen dagegen, die mehrere unabhängige Phasen der Wasserbindung enthalten, gibt der Gefrierpunkt lediglich die Phase mit der geringsten Dampfdruckerniedrigung an. Es ist aber nicht zu ersehen, wieviel des gesamten Wassers in der durch den Gefrierpunkt repräsentierten Phase enthalten ist oder mit welcher Kraft das übrige Wasser gebunden ist. Damit ist auch ein Schluß von der Größe der Gefrierpunktserniedrigung auf die osmotische Energie eines solchen Systems nicht möglich.

Es könnte darnach erscheinen, als ob die Gefrierpunktsbestimmung für die Untersuchung der Wasserbindung innerhalb organischer Systeme eine inadäquate Methode ist. Das ist aber keineswegs so, sie erfährt nur gewisse Einschränkungen, die sich aus ihrem Wesen ergeben. Nach den vorliegenden neueren Untersuchungen kann man nicht daran zweifeln, daß innerhalb eines Organismus keine Isotonie besteht, sondern daß erhebliche osmotische Spannungsdifferenzen vorhanden sind^{16, 17, 18, 19, 24, 28}. Die

Voraussetzung für das Bestehen von osmotischen Spannungsdifferenzen ist das Vorhandensein von Strukturen, die eine Ordnung ermöglichen. Als Strukturen in diesem Sinn sind Organe, Gewebe, Zellen und intracelluläre Gebilde anzusehen, obwohl deren Bedeutung für diese Frage mangels geeigneter Methoden noch nicht untersucht ist. Grundsätzlich kann jeder von solchen Strukturen bestimmte Raum besondere Eigenschaften der Wasserbindung aufweisen. Es ist eine Frage der *Größenordnung* eines Raumes mit charakteristischen Eigenschaften der Wasserbindung, ob mit der Gefrierpunktsbestimmung eine Aussage dazu möglich ist oder nicht. *Die zu einer Messung notwendige Menge darf nicht die zu unterscheidenden Räume der Wasserbindung gleichzeitig enthalten.* Aus technischen Gründen brauchen wir zu einer Messung Material in der Größenordnung von Gramm. Eine wesentliche Aussage über eine unterschiedliche Wasserbindung in verschiedenen Substraten ist mit Hilfe der Gefrierpunktsbestimmung mithin nur möglich für Räume, die größer sind als die zu einer Messung erforderliche Menge. Die Gefrierpunktsbestimmung als Methode für die Untersuchung der Wasserbindung ist daher nur sinnvoll im Vergleich von Geweben und Organen untereinander. Die Frage, ob *innerhalb* eines Gewebes, d. h. zum Beispiel zwischen extra- und intracellulärem Raum Isotonie besteht, ist mit Hilfe der Gefrierpunktsbestimmung nicht zu klären.

Es ist außerdem festzuhalten, daß auch in organischen Systemen jedem exakt bestimmten Gefrierpunkt eine entsprechende wäßrige Phase zugeordnet ist, wenn schon die darin enthaltene Wassermenge durch die Messung nicht erfaßt wird. Die osmotischen Druckdifferenzen, die sich aus den verschiedenen Gefrierpunkten zweier Gewebe ergeben, sind sicher real im Vergleich miteinander —, aber auch im Vergleich zu der alle Gewebe in gleicher Weise umspülenden Blutflüssigkeit von konstantem osmotischen Druck.

Nach den methodischen Voraussetzungen kann kein Zweifel daran bestehen, daß die von uns bestimmten Temperaturen wirklich Gefrierpunkte der betreffenden Gewebe darstellen. Diese Tatsache läßt sich aus dem Temperaturverlauf bei jeder einzelnen Messung nachweisen. Aber im Gegensatz zu der Erfahrung mit Blut oder Serum zeigen die Gefrierpunktserniedrigungen von Geweben bei insgesamt viel höheren Werten eine außerordentliche Variabilität. Unabhängig von den Unterschieden zwischen verschiedenen Species und Individuen ordnen sich bei jedem einzelnen Tier die Werte für die Gefrierpunkte der verschiedenen Gewebe nach einem bestimmten Muster. Die höchsten Werte finden sich für das Lebergewebe, dann kommt mit einigem Abstand das Nierengewebe. Demgegenüber weist das Muskelgewebe insgesamt eine geringere Gefrierpunktserniedrigung auf. Aber innerhalb der Muskulatur gibt es wieder charakteristische Gruppierungen. Die geringsten Werte finden sich

gewöhnlich für den Herzmuskel, dann kommt die Skelettmuskulatur und schließlich das Zwerchfell. Beim Zwerchfell finden sich Gefrierpunkts-erniedrigungen gleicher Größenordnung wie bei Leber und Niere. Es ist naheliegend anzunehmen, daß mit dem entsprechenden experimentellen Aufwand sich auch charakteristische Unterschiede innerhalb der Skelettmuskulatur herauschälen. SABATTANI²⁵ kam in seinen frühen Untersuchungen mit einer einfachen Gefrierpunktmethode zu der gleichen relativen Ordnung der Gefrierpunkts-erniedrigung für die verschiedenen von ihm untersuchten Gewebe des Hundes.

Es scheint sich auch bereits aus unseren Messungen nachweisen zu lassen, daß es charakteristische Unterschiede in den Gefrierpunkts-erniedrigungen der Gewebe verschiedener Species gibt. Diese Unterschiede beziehen sich im wesentlichen auf die parenchymatösen Organe. Beim Kaninchen betrugen in unseren Messungen die Durchschnittswerte für die Leber $-1,33^{\circ} \pm 0,04^{\circ}$ und für die Niere $-1,03^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$, beim Meerschweinchen $-1,19^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$ für die Leber und $-1,11^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$ für die Niere. Die Werte für das Nierengewebe erscheinen dabei auch unter Berücksichtigung des Einflusses der Überlebensdauer ohne Einschränkung vergleichbar. Die Differenz ist statistisch signifikant mit $P < 0,001$. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gefrierpunkts-erniedrigung des Lebergewebes ist weniger zuverlässig ($P = 0,01$). Charakteristisch ist aber, daß die Leberwerte bei den Kaninchen höher und die Nierenwerte niedriger sind als bei den Meerschweinchen.

Ein weiterer zuverlässiger Unterschied läßt sich in den Werten für das Lebergewebe von Kaninchen und Meerschweinchen einerseits und Ratte andererseits nachweisen. Der Durchschnittswert für die Messungen unmittelbar nach der Tötung beträgt für Meerschweinchen und Kaninchen gemeinsam $-1,17^{\circ} \pm 0,04^{\circ}$ und für die Ratte $-0,98^{\circ} \pm 0,04^{\circ}$. Die Differenz ist signifikant mit $P = 0,01$. Dagegen sind die Werte für die Skelettmuskulatur bei den untersuchten Species praktisch identisch —, für das Kaninchen $-0,99^{\circ} \pm 0,03^{\circ}$, für das Meerschweinchen $-1,02^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ und für die Ratte $-0,99^{\circ} \pm 0,04^{\circ}$.

Es ist naheliegend anzunehmen, daß sich auch Funktionszustände, Fütterung und ähnliche Faktoren in den Gefrierpunkts-erniedrigungen der Gewebe der einzelnen Tiere auswirken. Die Beobachtung, daß bei Kaninchen und Meerschweinchen die Werte für die Gefrierpunkts-erniedrigung der Leber in zwei signifikant differente Gruppen hoher und niederer Werte aufgelöst werden können, spricht in dieser Richtung. REISSNER²² fand nach Thyreoidektomie und Adrenalektomie bei Meerschweinchen und Ratten charakteristische Änderungen der Gefrierpunkts-erniedrigungen der Gewebe.

Die Beeinflussung der Gefrierpunkts-erniedrigung durch die Überlebensdauer ist am Beispiel des Lebergewebes bereits ausführlich dargestellt. Die Änderung der

Gefrierpunkte der anderen Gewebe mit der Überlebensdauer ist anscheinend weit geringer als bei der Leber.

Nach der bisherigen Auffassung würde man sowohl die Differenz der beobachteten Gefrierpunktserniedrigungen zu der des Blutes als auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen und die Veränderlichkeit während der Beobachtungszeit mit dem Auftreten von Spaltprodukten, insbesondere von Milchsäure, zu erklären versuchen. Gegen eine solche Annahme sprechen eine Reihe von wesentlichen Argumenten.

Zunächst ist die absolute Größe der Gefrierpunktserniedrigung durch die bisher als maximal bekannten Konzentrationen an Spaltprodukten nicht annähernd zu erklären. Konzentrationen von je 0,5% für Milchsäure und Glucose im Gewebe müssen nach den Angaben in der Literatur als maximal angesehen werden^{1, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 23}. Die Gefrierpunktserniedrigung für diese beiden Konzentrationen gemeinsam betrüge 0,15°. In den allermeisten Fällen ist nach den Analysenergebnissen nicht mehr als die Hälfte dieses Wertes anzunehmen. Neben der Milchsäure und Glucose treten die anderen Spaltprodukte an molekularer Konzentration zurück. Die maximalen Gefrierpunktserniedrigungen, die in dieser Untersuchung beobachtet wurden, liegen bei mehr als $-1,60^\circ$. Die Differenz gegenüber dem Blut beträgt in diesen Fällen mehr als $1,0^\circ$. Der Durchschnittswert für alle Messungen an Kaninchen und Meerschweinchen gemeinsam ($-1,12^\circ \pm 0,03^\circ$) liegt noch um $-0,54^\circ$ bis $-0,56^\circ$ unter der Gefrierpunktserniedrigung des Blutes. Ausgehend von der Hypothese, daß während des Lebens im gesamten Organismus Isotonie bestünde, müßten diese zusätzlichen Gefrierpunktserniedrigungen durch postmortale Spaltungsprozesse bedingt sein. Für die Anhäufung von Spaltprodukten dieser Konzentration ist einfach kein Anhalt vorhanden. Schon in den Untersuchungen von HILL und KUPALOV⁷ und von MEYERHOF¹³ hatte sich herausgestellt, daß die bei der Ermüdung beobachtete relativ geringe Erniedrigung des Gefrierpunktes von Froschmuskeln (bis zu etwa 0,2°) nicht mehr als zu zwei Dritteln durch das Auftreten von Spaltprodukten erklärt werden könnte.

Weiterhin ist es bemerkenswert, daß beim Vergleich der Gewebe untereinander die analytisch bestimmten Konzentrationen an Spaltprodukten, — insbesondere von Milchsäure, — keine Beziehung zu den beobachteten Gefrierpunktserniedrigungen zeigen. Das wird insbesondere deutlich am Beispiel des Muskelgewebes. Im Muskelgewebe finden sich im allgemeinen die relativ höchsten Milchsäurekonzentrationen⁶. Muskelgewebe der verschiedensten Herkunft — mit Ausnahme des Zwerchfells — ergab in unseren Messungen die Gruppen mit niedrigsten Durchschnittswerten. Nach den Messungen REISSNERS²² erfährt das Muskelgewebe während der Überlebenszeit auch nur relativ geringe Änderungen des Gefrierpunktes trotz der hohen Zunahme der Milchsäurekonzentration. Auf der anderen Seite kommen im Lebergewebe mit zunehmender Überlebensdauer in einzelnen Fällen Änderungen der Gefrierpunktserniedrigung vor, die weit höher sind als sie die bisher bekannten maximalen Konzentrationen an Spaltprodukten verursachen könnten. Auch die zeitlichen Verhältnisse sprechen nicht für eine wesentliche Bedeutung der Spaltprodukte für die beobachteten Gefrierpunktserniedrigungen und deren Veränderung. Nach den Erfahrungen REISSNERS²² nimmt die Gefrierpunktserniedrigung von Muskelgewebe während der ersten 24 Std nach dem Tode im allgemeinen etwas ab, und erst nach dieser Frist tritt eine deutliche Zunahme ein. Die maximale Konzentration an Spaltprodukten im üblichen Sinne wird aber mit Sicherheit innerhalb der ersten 24 Std erreicht — also innerhalb der Phase der abnehmenden oder zumindest nicht steigenden Gefrierpunktserniedrigung.

Alle diese Argumente führen zu dem Schluß, daß weder die im Vergleich zum Blut viel größeren Gefrierpunktserniedrigungen tierischer Gewebe noch deren Veränderungen durch das Auftreten von Spaltprodukten erklärt werden können. Damit ist nicht gesagt, daß die Spaltprodukte ohne Bedeutung sind. Aber es müssen ganz andere Mechanismen im Spiel sein. Nach der bisher üblichen Hypothese von der osmotischen Isotonie im Organismus ist eine Änderung der Gefrierpunktserniedrigung nur vorstellbar durch eine entsprechende Änderung der Konzentration gelöster Substanzen im gesamten Wasserraum des Organismus. Einer Gefrierpunktsänderung entspricht in einem solchen System eine direkt proportionale Änderung der osmotischen Energie. Diese Beziehung ist aber nicht zwingend für ein kompliziertes oder ein geregeltes System mit mehreren Phasen. In einem solchen System könnten Gefrierpunktsänderungen, d. h. Änderungen der Phase mit der höchsten Dampfspannung, eintreten, ohne daß überhaupt eine Änderung der osmotischen Energie des Systems vorläge. Das wäre z. B. der Fall, wenn es zur Aufhebung der Trennung zwischen der den Gefrierpunkt bestimmenden Phase und einer anderen Phase des Systems mit höherer osmotischer Spannung käme. Daß mit der Existenz solcher getrennter Phasen gerechnet werden muß, geht eindeutig aus der Analyse der Wasserbindung im Kartoffelgewebe hervor²¹. Aus dieser letzteren Untersuchung ergibt sich weiterhin, daß etwa die Hälfte der osmotischen Energie des lebenden Kartoffelgewebes nicht auf die osmotische Aktivität von Ionen und gelösten niedrigmolekularen Substanzen zurückgeführt werden kann. Es muß auf Grund dieser Ergebnisse in Erwägung gezogen werden, daß die höhere Gefrierpunktserniedrigung der tierischen Gewebe und deren Veränderungen im überlebenden Zustand nicht oder nur zum Teil durch eine entsprechende Konzentration gelöster Substanzen bedingt ist, die nach der bisherigen Auffassung allein dafür verantwortlich ist.

Von besonderer Bedeutung ist die Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit einer Anzahl neuerer Arbeiten, die auf einem anderen methodischen Weg durchgeführt wurden. STERN, EGGLESTON, HEMS und KREBS²⁸ beobachteten, daß Gewebsschnitte auch in den besten Suspensionsflüssigkeiten Wasser aufnehmen, wenn nicht für eine hinreichende O₂-Zufuhr Sorge getragen ist. Sie schlossen daraus, daß die Aufrechterhaltung der normalen Wasserverteilung im Gewebe oxydative Energie erfordert. OFIE^{16, 17, 18} stellte in ausgedehnten Versuchen fest, daß überlebendes Gewebe aus blutisotonen Medien Wasser aufnahm. Um diese Wasseraufnahme zu verhindern mußten deutlich hypertone Lösungen angewandt werden, deren Konzentration für die einzelnen Organe charakteristisch verschieden war. Für Leber und Niere waren die höchsten Konzentrationen notwendig, nämlich etwa doppelt so hohe Konzentrationen, wie sie im Blut vorliegen. ROBINSON²⁴ zeigte an Nierenschnitten, daß eine Herabsetzung oder Unterbindung des oxydativen Stoffwechsels mit den verschiedensten Methoden zur Wasseraufnahme aus isotonen Medien führte. Mit der Wiederherstellung des oxydativen Stoffwechsels wurde das aufgenommene Wasser aus den Zellen wieder entfernt. Um in Nierenschnitten, deren Stoffwechselgröße durch Abkühlung herabgesetzt war, die Wasseraufnahme zu

verhindern, waren auch in ROBINSONS Versuchen Medien von der doppelten osmotischen Konzentration des Blutes notwendig.

Diese Versuche wurden dahingehend interpretiert, daß das Zellinnere gegenüber dem extracellulären Raum hypertotonisch sei und daß die Flüssigkeitsverteilung unter physiologischen Bedingungen vom oxydativen Stoffwechsel abhängig sei. Mit der Herabsetzung des oxydativen Stoffwechsels kommt es danach zum Übertritt von Wasser aus dem extracellulären in den hypertonen intracellulären Raum. Auf Grund der Erfahrungen von OPIE^{16, 17, 18} und ROBINSON²⁴ mußte angenommen werden, daß das Wasser in Leber- und Nierengewebe eine etwa doppelt so hohe osmotische Spannung aufweist wie im Blut.

Durch unsere Messungen ist zum erstenmal direkt bewiesen, daß die aus diesen Ergebnissen postulierte höhere osmotische Spannung im Wasser der Gewebe tatsächlich besteht. Die Übereinstimmung in den Einzelergebnissen ist bemerkenswert. Auch wir fanden die höchsten osmotischen Spannungen —, d. h. die größten Gefrierpunktserniedrigungen bei Leber und Niere mit etwa dem doppelten Wert des Blutes.

Zusammenfassung.

Es wurden 220 Gefrierpunktsbestimmungen an verschiedenen Geweben von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Katze durchgeführt. Die dazu verwandte Methode erlaubt, die Realität des Gefrierpunktes in jeder einzelnen Messung aus dem registrierten Temperaturverlauf nachzuweisen. Mit Hilfe eines neuen Impfverfahrens wurden Unterkühlungen vermieden bzw. gezielte Unterkühlungen von etwa $0,2^\circ$ zugelassen. Die Untersuchung führte zu den folgenden Ergebnissen.

1. In 125 Messungen an verschiedenen Geweben von Kaninchen und Meerschweinchen — von unmittelbar nach dem Tode bis 50 Std später — ergab sich ein Mittelwert für den Gefrierpunkt von $-1,12^\circ \pm 0,03^\circ$. Für 28 Messungen, die unmittelbar nach der Tötung der Tiere durchgeführt wurden, fand sich ein Mittelwert von $-1,08^\circ \pm 0,04^\circ$. Diese Durchschnittswerte liegen etwa doppelt so hoch wie der Gefrierpunkt des Blutes.

2. Die Gefrierpunktserniedrigungen für die verschiedenen Organe sind nicht gleich (Tab. 1, 2 und 3). Bei Kaninchen und Meerschweinchen finden sich die höchsten Werte für das Lebergewebe, dann für die Niere. Für Muskelgewebe finden sich niedrigere Werte. Die niedrigsten beobachteten Werte liegen für den Herzmuskel vor, es folgt mit den nächsthöheren Werten die Skelettmuskulatur. Für das Zwerchfell fanden sich Werte von der gleichen Größenordnung wie für Leber und Niere. Nach den wenigen Messungen, die an Geweben von Ratten und Katzen vorliegen, fügen sich die Werte für diese beiden Species in ein ähnliches Muster.

3. Es finden sich in unseren Messungen signifikante Unterschiede in den Werten für die verschiedenen Species (Tab. 6). Die Gefrierpunkte

für die Leber von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte sind verschieden. Ebenso die Gefrierpunkte für das Nierengewebe von Kaninchen und Meerschweinchen. Dagegen hat die Gefrierpunktserniedrigung der Skelettmuskulatur für diese drei Species praktisch den gleichen Wert.

4. Die Gefrierpunkte aller Gewebe, insbesondere der Leber, erfahren mit der Überlebensdauer charakteristische Veränderungen (Tab. 7). In der ersten Phase (0 bis 3—6 Std) kommt sowohl ein Abfall als auch ein Anstieg der Gefrierpunktserniedrigung vor. Der Abfall ist dabei signifikant an die hohen Ausgangswerte gebunden. In der zweiten Phase (etwa 3—24 Std) kommt bei den parenchymatösen Organen allgemein eine Zunahme der Gefrierpunktserniedrigung zur Beobachtung. Mit mehr als 30 Std Überlebensdauer finden sich wieder zunehmend fallende Werte.

5. Weder die durchschnittliche Differenz zwischen den Gefrierpunkten des Gewebes und des Blutes, noch die Differenz zwischen den Gefrierpunkten der verschiedenen Organe, noch die Größe der Änderung der Gefrierpunkte mit zunehmender Überlebenszeit kann durch die Konzentration der bisher bekannten Spaltprodukte erklärt werden.

Literatur.

- ¹ BARRENSCHEEN, H. K., T. PANY u. R. BERGER: *Biochem. Z.* **229**, 196 (1930). —
- ² BOTTAZZI, F.: *Arch. di Fisiol.* **3**, 547 (1905). — ³ COLLIP, J. B.: *J. of Biol. Chem.* **42**, 207 (1920). — ⁴ DAKIN, W. J.: *Biochemic. J.* **3**, 273 (1908). — ⁵ FANO, I., e F. BOLTAZZI: *Arch. ital. de Biol. (Pisa)* **26**, 45 (1896). — ⁶ FENZ, E., u. H. POPPER: *Biochem. Z.* **229**, 397 (1930). — ⁷ HILL, A. V., and P. S. KUPALOV: *Proc. Roy. Soc. Lond.*, B **106**, 445 (1930). — ⁸ HILL, A. V.: *Adventures in Biophysics*. Oxford University Press 1931. — ⁹ HIMWICH, H. E., and SH. A. JACOBSON: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **25**, 53 (1927). — ¹⁰ IRVING, J. T.: *Biochemic. J.* **22**, 1508 (1928). — ¹¹ KORANYI, A. VON: *Z. klin. Med.* **33**, 1 (1897). — ¹² MARGARIA, R.: *J. of Physiol.* **70**, 417 (1930). — ¹³ MEYERHOF, O.: *Biochem. Z.* **226**, 1 (1930). — ¹⁴ NAGAYA, T.: *Pflügers Arch.* **221**, 720 (1928). — ¹⁵ NAGAYA, T.: *Pflügers Arch.* **221**, 733 (1928). — ¹⁶ OPIE, E. L.: *J. of Exper. Med.* **89**, 185 (1949). — ¹⁷ OPIE, E. L.: *J. of Exper. Med.* **91**, 285 (1950). — ¹⁸ OPIE, E. L., and M. B. ROTHBARD: *Arch. of Path.* **50**, 800 (1950). — ¹⁹ PICHOTKA, J.: *Z. Biol.* **105**, 181 (1952). — ²⁰ PICHOTKA, J., W. HÖFLER u. J. REISSNER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **222**, 450 (1954). — ²¹ PICHOTKA, J., u. W. HÖFLER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **222**, 464 (1954). — ²² REISSNER, J.: *Dissertation*. Freiburg 1954. — ²³ RIESSER, O., u. W. SCHNEIDER: *Pflügers Arch.* **221**, 711 (1929). — ²⁴ ROBINSON, J. R.: *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **137**, 378 (1950). — ²⁵ SABBATANI, L.: *J. Physiol. et Path. gén.* **3**, 939 (1901). — ²⁶ SCHLIEFER, C.: *Z. vergl. Physiol.* **9**, 478 (1929). — ²⁷ SNEDECOR, G. W.: *Statistical Methods*, 4th Ed., The Iowa State College Press; Ames, Iowa. — ²⁸ STERN, J. R., L. V. EGGLESTON, R. HEMS and H. A. KREBS: *Biochemic. J.* **44**, 410 (1949). — ²⁹ STRAUSS, H.: *Z. diät. physikal. Ther.* **8**, 7 (1903). — ³⁰ URANO, F.: *Z. Biol. N. F.* **32**, 212 (1908).

Doz. Dr. J. PICHOTKA, Freiburg/Br., Physiolog. Institut d. Univ.

Aus dem Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik München.

Über eine neue blutdrucksenkende, darm- und uteruserregende Substanz im menschlichen Urin*.

Von

E. WERLE und E. G. ERDÖS.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Mai 1954.)

Urin gesunder Menschen enthält eine darm- und uteruserregende, blutdrucksenkende Substanz, die sich gegen alle bekannten Stoffe ähnlicher pharmakologischer Wirkung abgrenzen läßt. Sie ist kochbeständig und ist höchstwahrscheinlich ein Polypeptid. Wir bezeichnen sie vorläufig als Substanz Z^{28c}.

Anreicherung der Substanz Z.

Frischer, unter Toluol gesammelter Urin von gesunden Männern wird nach NOBLE^{18a} mit Zinkferrocyanid gefällt. Zu je 1000 cm³ Urin werden 11,25 cm³ einer molaren Kaliumferrocyanidlösung gegeben, dann werden unter kräftigem Rühren 10 cm³ molare Zinksulfatlösung zugetropft. Nach einigem Stehen wird vom entstandenen Zinkferrocyanid-Niederschlag abzentrifugiert. Das Überstehende wird verworfen. Der Niederschlag wird 2mal mit je 250 cm³ alkoholischer Ammoniaklösung (80%iger Alkohol + 1% NH₃) auf der Zentrifuge eluiert. Beim Stehen über Nacht bei 0° fallen aus den vereinigten NH₃-Eluaten unwirksame Ballaststoffe aus, die abfiltriert und verworfen werden. Das Eluat wird anschließend im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in einer kleinen Menge dest. Wassers gelöst und dann mit der 10fachen Menge 96%igem Alkohol versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Nach dem Verdampfen des Alkohols im Vakuum wird die verbleibende Lösung mit 10%iger Bleiacetatlösung bis zur vollständigen Fällung versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen, aus dem Überstehenden wird das Blei mit 0,5 n-H₂SO₄ entfernt, dann wird neutralisiert. Die so erhaltene Lösung wird mit der gleichen Menge 2 n NaOH versetzt und nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gegen fließendes Wasser dialysiert. Dann wird das noch alkalische Innendialysat (pH über 10) neutralisiert und soweit eingengt, daß die 5 l Urin entsprechende Extraktmenge sich in etwa 10 cm³ wäßriger Lösung befindet. Jetzt wird die Substanz Z am besten bei 70° mit Natriumtetraphenylborat** ausgefällt und der Niederschlag auf der Zentrifuge mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen. Der Rückstand wird in 96%igem Methanol aufgenommen, vom Unlöslichen wird abzentrifugiert. Nach dem Vertreiben des Alkohols im Vakuum wird die Substanz Z wieder in Wasser gelöst, und zwar so, daß 1 cm³ der Lösung 1 l Urin entspricht. Im günstigsten Fall enthielt 1 cm³ dieser schwach gelben Lösung noch 1,2 mg organische Substanz.

* Auszugsweise vorgetragen am 19. Intern. Physiologenkongreß Montreal 1953.

** „Kalignost“ Heyl & Co.

Bei diesem Reinigungsgang (vgl. Schema) würden Substanzen wie Kallidin, Bradykinin oder Substanz P, wenn sie in normalem Harn enthalten wären, eliminiert. Bei der Reinigung wird zwischen Schritt 9 und 10 eine blutdrucksteigernde Substanz abgetrennt. Da ihre Wirkung durch Dibenamin umgekehrt wird, dürfte es sich um ein Brenzkatechinamin handeln (Abb. 3a).

Die Ausbeute an Substanz Z ist unabhängig davon, ob steriler oder nicht steriler Urin von Männern oder Frauen aufgearbeitet wird. Nach orientierenden Versuchen enthält steriler Schweine-Urin sehr viel weniger Substanz Z als Menschenurin; in Rattenurin scheint sie zu fehlen.

Schema zur Anreicherung der Substanz Z aus menschlichem Urin.

Eliminiert:



- | | |
|---|---|
| Harn | |
| ↓ | |
| 1. Füllen mit Zinkferrocyanid | Restlösung |
| ↓ | |
| 2. Fällung mit 80% Alkohol + 1% NH ₃ eluieren, Eluat zur Trockne einengen | Kallikrein, Depressan, Substanz U |
| ↓ | |
| 3. Rückstand in 90% Alkohol lösen | Unlösliche Bestandteile, Proteine |
| ↓ | Kallikrein, Depressan. |
| 4. Lösung im Vakuum einengen, Rückstand in Wasser lösen | Unlösliche Bestandteile |
| ↓ | |
| 5. Ausfällen von Verunreinigungen durch Bleiacetat | Farbstoffe |
| ↓ | |
| 6. Entfernen von überschüssigem Blei durch 1/2 n-H ₂ SO ₄ | Blei |
| ↓ | |
| 7. Zusetzen des gleichen Volumens 2 n-NaOH zur verbleibenden Lösung und 60 min langes Belassen bei Zimmertemperatur | Wenn vorhanden: Substanz P zu 50%, HHL-Hormone |
| ↓ | |
| 8. 6 Std dialysieren gegen fließendes Wasser, neutralisieren | Histamin, Salze. Wenn noch vorhanden: Substanz P, Kallidin (Bradykinin) zu 70 bis 100% zerstört und ausdialysiert |
| ↓ | |
| 9. Lösung im Vakuum einengen und mit Kalignost fällen | |
| ↓ | |
| 10. Niederschlag auswaschen mit Aceton | Kalignost und soweit (noch) vorhanden Histamin, 5-Oxytryptamin und eine blutdrucksteigernde Substanz, evtl. Nicotin |
| ↓ | |
| 11. Lösen des Rückstandes in 96% Methylalkohol | Unlösliche organische Substanzen |
| ↓ | |
| 12. Verjagen des Methylalkohols und lösen des Rückstandes in Wasser | |

Pharmakologische Wirkungen der Substanz Z.

1. Am isolierten Darm (Abb. 1). Substanz Z kontrahiert den atropinisierten isolierten *Meerschweinchendarm* mit einer Latenzzeit, die deutlich größer ist als bei Histamin. Die Wirkung wird durch Antistin, Nicotin oder Dibenamin nicht beeinflusst. Eine Standardisierung der Substanz Z mit Hilfe von Histamin ist nicht möglich, weil das Wirksamkeits-

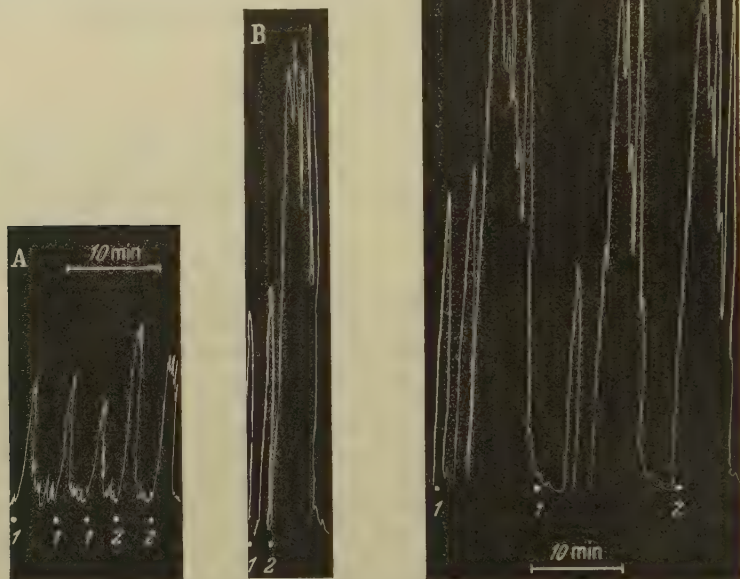


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1. Wirkung der Substanz Z am isolierten Meerschweinchendarm und Rattenuterus. Vergleich mit der Wirkung von Substanz P. A Isolierter Meerschweinchendünndarm, in 12 cm^3 atropinisierte Tyrodelösung suspendiert. B Isolierter atropinisierte Rattenuterus (Dioestrus) in 12 cm^3 atropinisierte Tyrodelösung suspendiert. Bei $1.8 \text{ } \gamma/\text{cm}^3 = 0.16 \text{ Einheiten}/\text{cm}^3$ Substanz P; bei $2.15 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ Substanz Z.

Abb. 2. Wirkung der Substanz Z am isolierten Rattenuterus in Gegenwart von Dibenamin. Isolierter Rattenuterus (Dioestrus) suspendiert bei 34°C in 12 cm^3 atropinisierte Tyrodelösung. $1.10 \text{ } \gamma$ Dibenamin, nach 4 min ohne Spülen bei $1.5 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ Substanz Z; $2.15 \text{ } \gamma/\text{cm}^3$ Substanz Z.

verhältnis gleicher Mengen von Substanz Z und Histamin mit den Darmpräparaten stark wechselt. Die aus $5\text{--}20 \text{ cm}^3$ Urin erhaltene Menge der Substanz Z verursacht eine submaximale Kontraktion eines in 12 cm^3 atropinisierte Tyrodelösung suspendierten $3\text{--}4 \text{ cm}$ langen Stückchens des isolierten Meerschweinchendarms. In reinen Präparaten ist diese Wirkung an $0.5\text{--}2 \text{ } \gamma$ organische Substanz pro Kubikzentimeter Badflüssigkeit gebunden. Für vergleichende Bestimmungen der Substanz Z ist der isolierte Meerschweinchendarm am besten geeignet.

FrISChe oder 24 Std im KÜhlschrank aufbewahrte *Kaninchendarm*-präparate sind gegenüber Substanz Z fast ebenso empfindlich wie Meer-schweinchendärme.

Auch isolierte *Hunde*-, *Katzen*- und *Schweinedärme* sind gegenüber Substanz Z sehr empfindlich. Von besonderem Interesse ist es, daß das

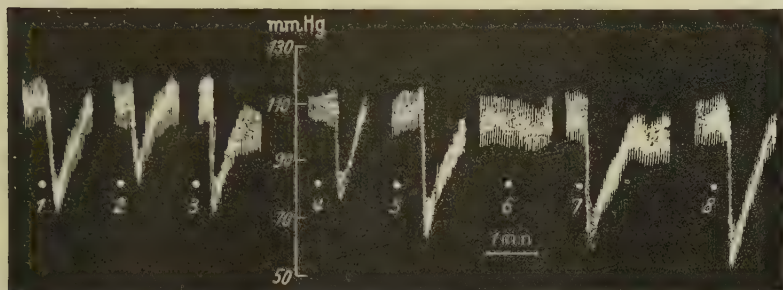


Abb. 3. Wirkung der Substanz Z auf den Blutdruck beim Hund. Inaktivierung der Substanz Z durch Rinderserum. Männlicher Hund, Bastard, 13,5 kg. Morphium-Pernocton-Narkose. Carotisblutdruck. LUDWIGSches Quecksilbermanometer. 1 0,15 Kallikrein-Einheiten, 2 0,2 cm³ Substanz Z (240 γ organische Substanz), 3 0,33 cm³ Substanz Z (400 γ organische Substanz) nach 20 min langem Kochen mit 2 n HCl, 4 6 γ Histamin, 5 0,4 cm³ Substanz Z (480 γ organische Substanz) + 0,3 cm³ Rinderserum ohne Inkubation, 6 wie bei 5, jedoch nach 20 min langer Inkubation bei 20°, 7 6 γ Histamin nach 20 min langer Inkubation mit 0,3 cm³ Rinderserum, 8 dasselbe wie unter 5.

isolierte *Rattencolon* auf Substanz Z praktisch nicht anspricht, was ihre Abgrenzung gegen Substanz P^{7,10} Kallidin, Bradykinin^{22c}, Darmstoff²⁷ und 5-Oxytryptamin¹⁰ ermöglicht, die das Rattencolon mehr oder weniger stark zur Kontraktion erregen.

2. Am isolierten Uterus (Abb. 2). Am empfindlichsten gegen Substanz Z ist der isolierte *Rattenuterus* im Oestrus und Dioestrus. Unter den oben angegebenen Bedingungen bewirkt die in 5—10 cm³ Urin enthaltene Menge der Substanz Z eine submaximale Kontraktion.

Die Uteri wurden in Tyrodelösung bei 37° oder zur Vermeidung von Spontankontraktionen in Tyrodelösung mit vermindertem Calcium- und Glucosegehalt bei 33° bis 22°¹⁵ suspendiert. Mit der Herabsetzung der Temperatur ist allerdings eine Minderung der Empfindlichkeit der Präparate verbunden. Auch Streifen aus *Schafsuterus* und virginellem *Kaninchenuterus*, ferner isolierte *Schweine*- oder *Hundeureter* sprechen auf die Substanz Z an.

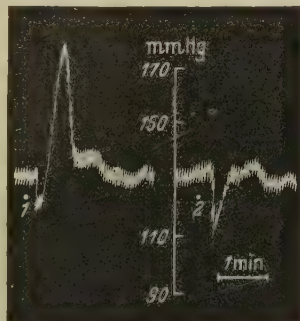


Abb. 3a. Wirkung eines Substanz-Z-Präparates vor und nach Kalignostfällung. Katze, weiblich, 2,7 kg. Pernocton-Narkose, atropinisiert (5 mg Atropinsulfat); Carotisblutdruck, LUDWIGSches Quecksilbermanometer. 1 i.v. Injektion von Substanz Z; Präparat der Reinigungsstufe 8, 0,07 cm³/kg. 2 i.v. Injektion von Substanz Z; Präparat der Reinigungsstufe 10, 0,07 cm³/kg (80 γ /kg).

Wirkung auf den Blutdruck (Abb. 3). Substanz Z verursacht nach i. v. Verabreichung bei narkotisierten Hunden, Katzen, Kaninchen und Ratten eine vorübergehende Blutdrucksenkung. Bei Hunden wird durch 30—400 γ Substanz Z pro Kilogramm Tier der Blutdruck um 20—40 mm Hg gesenkt. An der Ratte verursacht die in 5 cm³ Urin enthaltene Menge der Substanz Z pro 100 g Tier eine Senkung von 20—40 mm Hg.

Wirkung auf die Diurese (Abb. 4). Substanz Z hat bei Ratten eine signifikante antidiuretische Wirkung nach intraperitonealer, nicht aber nach s. c. Verabreichung.

Bei 16 Ratten wurden pro 100 g Tier je 0,2 cm³ Lösung der Substanz Z entsprechend 240 γ organischer Substanz i. p. verabreicht. Nach der Injektion der Substanz Z erhielten die Tiere durch eine Sonde 5 cm³ lauwarmes Wasser pro 100 g Körpergewicht. Die Kontrolltiere erhielten jeweils an Stelle von Substanz Z physiologische NaCl-Lösung oder um eine unspezifische Wirkung auszuschließen eine Lösung, in der die Substanz Z durch Inkubieren der Reinigungsstufe Nr. 7 (siehe Schema) bei 100° zerstört worden war.

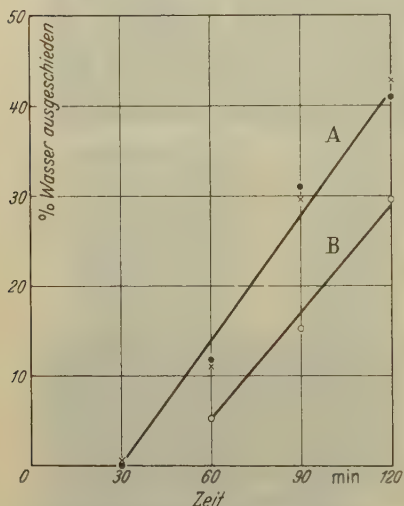


Abb. 4. Wirkung der Substanz Z auf die Diurese der Ratte. A • inaktivierte Substanz Z. $\times$ RINGER-Lösung. B o Substanz Z. Versuchsbedingungen siehe Text.

Die Wirkung auf die Diurese wurde nach BURN^{4a} beurteilt. Die Wasserausscheidung war bei beiden Kontrolltiergruppen gleich. Nach i. p. Injektion der Substanz Z-Lösung beginnt die Diurese, die dem Wasserstoß folgt, 30 min später als bei den Kontrollen, dauert im allgemeinen 2—2,5 Std und erreicht im Laufe von 5 Std, während derer die Beobachtung durchgeführt wird, Werte, die sich denen der Kontrollversuche nähern. Die signifikante Differenz für

die Halbstundenwerte beträgt im Mittel nach 1 Std 6,78, nach 1,5 Std 4,14 und sinkt dann bis auf Werte von 2,3 ab. Der Mittelwert für die Zeit der maximalen Ausscheidung liegt für RINGER-Lösung bei 83, für Substanz Z bei 124 min. Die Differenz zwischen diesen beiden letzten Werten ist signifikant ($k = 4,12$). Die Verzögerung beträgt etwa 50%.

In besonderen Versuchen wurde ausgeschlossen, daß die antidiuretische Wirkung der Substanz Z-Lösungen auf Hypophysenhinterlappenhormon beruht, das z. B. bei Rauchern im Urin erscheinen kann^{4b, 18b, 25}. Wir überzeugten uns davon, daß dem Urin zugesetztes antidiuretisches Hormon (Hypophysin Hoechst) bei der Aufarbeitung des Urins auf Substanz Z vollkommen zerstört wird.

Bei 3 Ratten in Urethannarkose verursachte die i. p. Injektion der in den Diureseversuchen angewandten Menge der Substanz Z eine Senkung des Blutdruckes von durchschnittlich 19 mm Hg für die Dauer von 1,5 Std. In der Beob-

achtungszeit sank bei narkotisierten Kontrolltieren der Blutdruck auch ohne Gabe von Substanz Z bis um 10 mm. Wir möchten daher die Verzögerung der Diurese nicht auf die Blutdrucksenkung und eine damit verbundene Verminderung der Nierendurchblutung sondern auf eine spezifische antidiuretische Wirkung der Substanz Z zurückführen.

Chemische Eigenschaften der Substanz Z.

Substanz Z ist kochbeständig. Sie kann bei neutraler Reaktion 1 Std lang, bei p_H 0 (n HCl) 15 min lang ohne Wirksamkeitsverlust auf 100° gehalten werden. Durch Kochen in n-NaOH wird sie innerhalb 15 min zerstört, bei 20° ist die Substanz gegen n-NaOH 3 Std lang praktisch beständig. Durch salpetrige Säure wird sie zerstört. Wahrscheinlich ist ihre Wirkung an freie Aminogruppen gebunden. Durch Natriumtetraphenylborat (Kalignost Heyl & Co.) und durch Pikrinsäure, nicht aber durch Flavian- und Pikrolonsäure wird Substanz Z gefällt. Sie ist löslich in 90% Äthanol und 96% Methanol, unlöslich in Aceton, Äther oder Toluol. Bei der Dialyse gegen fließendes Wasser durchdringt sie langsam die Cellophanmembran (Cellophan Nr. 400) und ist nach 48stündiger Dialyse nicht mehr nachweisbar. Durch Tierkohle wird Substanz Z reversibel adsorbiert.

Verhalten gegenüber Fermenten und Blutserum.

Substanz Z wird durch proteolytische Enzyme inaktiviert. Da solche auch im Urin vorkommen, dürfte die Konzentration der Substanz Z bei längerem Stehen des Urins abnehmen. Auch durch Blutserum wird Substanz Z inaktiviert. 0,2 cm³ der Lösung werden z. B. durch 0,1 bis 0,2 cm³ Rinderserum bei 37° innerhalb von 10 min inaktiviert (Abb. 3). Die Inaktivierungsgeschwindigkeit nimmt in der Reihe Rinder-, Ratten-, Meerschweinchen- und Menschenserum ab; sie ist bei 37° sehr viel größer als bei 0° . Durch 2 Std langes Erhitzen auf 58° wird die Inaktivierungsfähigkeit der Seren für Substanz Z stark abgeschwächt. Auch hämolyzierte, rote Blutkörperchen, ferner Rinder- und Meerschweinchengalle inaktivieren Substanz Z, wenn auch wesentlich langsamer als Serum. Kristallisiertes Trypsin greift sie in 24 Std bei p_H 7,5 nicht an, durch Chymotrypsin wird sie bei 37° und p_H 7,4 zerstört, ebenso durch Dymal²³, einem proteolytisch stark wirksamen Enzympräparat aus Reisschimmel.

Abgrenzung der Substanz Z gegen Stoffe mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung.

In Tab. 1 und 2 sind die Daten zusammengestellt, auf Grund derer sich die Substanz Z von Stoffen ähnlicher Wirkung abgrenzen läßt. Am wichtigsten erscheint die Unterscheidung der Substanz Z von Bradykinin, Kallidin, „Darmstoff“ und Substanz P. Nach VOGT^{16, 27} ist der Darmstoff eine organische, lipoidlösliche Säure, die nicht blutdrucksenkend wirkt.

Schwieriger ist die Abgrenzung gegen Substanz P. Dieses von v. EULER^{9a} zuerst im Darm aufgefundene Polypeptid wirkt, wie Substanz Z darm- und uteruserregend und blutdrucksenkend. Es sei auf folgende Unterschiede zwischen beiden Substanzen besonders hingewiesen. Substanz P wird durch Trypsin zerstört, Substanz Z nicht^{9b, 19}. Die Wirkung der Substanz Z wird durch salpetrige Säure aufgehoben, die der Substanz P nicht. Substanz P wird durch 10 min langes Kochen mit n-HCl zerstört¹², Substanz Z bleibt erhalten. Substanz P verliert bei 1 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit n-NaOH etwa 50%, in einigen Stunden 100% ihrer Aktivität^{6, 9a}, während Substanz Z erhalten bleibt. Nach v. EULER und nach eigenen Versuchen wird die Aktivität der Substanz P durch Inkubieren mit Serum nicht aufgehoben, während Substanz Z inaktiviert wird. Eine Probe der Substanz P, die am Meerschweinchendarm mit einer Probe der Substanz Z etwa wirkungsgleich war, war am Rattenuterus wirkungslos, während die Substanz Z eine sehr starke Kontraktion auslöste. Eine Probe der Substanz P, die uns freundlicherweise von Herrn Prof. U. S. v. EULER überlassen wurde, war am Rattenuterus (im Diöstrus) der für die Substanz Z das empfindlichste Organ darstellt, unwirksam.

Aus α_2 -Serumglobulin wird *Kallidin*^{28a, b} durch Kallikrein und *Bradykinin* durch Trypsin entwickelt^{1, 2, 22}. Die beiden Polypeptide sind wahrscheinlich identisch, beide wirken blutdrucksenkend und erregend auf

Tabelle 1.

Pharmakologische Abgrenzung der Substanz Z gegen Stoffe ähnlicher Wirkung.

Wirkung auf	Oestrus Rattenuterus	Diöstrus	Rattendarm	Diurese Ratte	Blutdruck der Ratte	Meerschweinchendarm	Kaninchendarm	Blutdruck des Kaninchens	Kaninchenuterus (virgin.)	Blutdruck der Katze	Blutdruck des Hundes	Ureter / Schwein / Hund	Schafuterus	gefunden im menschl. Harn	gefunden im Hunde-harn
Substanz Z . . .	+	+	o	—	—	+	+	—	+	—	—	+	+	+	—
Bradykinin . . .		+	+	—	—	+	+	—		—	—				
Darmstoff . . .		+	+			+	+	o							
5-Oxytryptamin	+	+	+	—		+	+	—		±	±			+	+
Kallidin	+	+	±	o	—	+	+	—	+	±	—	+		—	—
Kallikrein . . .		o	o	o	—	o	+	—		—	—	+		+	+
Substanz P. . .		+	+			+	+	—	+	—	—	+			
Substanz U. . .						+			+	—					+

+ steigert den Blutdruck, wirkt diuretisch, kontrahiert. — senkt den Blutdruck, wirkt antidiuretisch, entspannt. o inaktiv.

glattnuskelige Organe. Die beiden Stoffe stehen der Substanz Z am nächsten. Folgende Tatsachen erlauben aber eine Abgrenzung gegen sie. Werden am isolierten Meerschweinchendarm etwa gleich stark wirksame Mengen Kallidin und Substanz Z mit 2 n NaOH 1 Std bei Zimmertemperatur belassen und anschließend 6 Std dialysiert, so verschwindet das Kallidin zu 70—100%, während bei der Substanz Z praktisch kein Verlust eintritt. Das Wirksamkeitsverhältnis gleicher Proben von Kallidin und Substanz Z wechselt bei verschiedenen Darmpräparaten stark. Aus dem bisher gesagten geht ohne weiteres hervor, daß *Acetylcholin*, *Adenosin* und *Histamin* von Substanz Z verschieden sind. Bei der geschilderten Anreicherung der Substanz Z würden diese Substanzen, soweit im Urin vorhanden, zerstört oder eliminiert.

*Enteramin*⁸, *Serotonin*²⁰ und *Thrombocytin*²¹ sind mit 5-Oxytryptamin identisch, das im Serum²⁴ im Harn und in verschiedenen Organen vorkommt. Das antidiuretisch wirkende 5-Oxytryptamin wird von der

Tabelle 2. Chemische und pharmakologische Abgrenzung der Substanz Z gegen Stoffe ähnlicher pharmakologischer Wirkung.

	Nach Behandlung mit							Nach Blockieren mit		Löslich in		
	Serum 35° C	1 n HCl 100° C 20'	1 n NaOH 100° C 20'	1 n NaOH 20° C 180'	pH 7 100° C 60'	Trypsin 35° C 20 Std	Chymotrypsin 35° C	Atropin	Antihistamin	Dest. Wasser pH 7	Aceton/wäßrig	Äthylalkohol/wäßrig
Substanz Z	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+
Acetylcholin	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+
Adenosin	—	—	+	—	+	+	—	+	—	+	—	—
Bradykinin	—	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+
Darmstoff Vogt	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+
Histamin	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
5-Oxytryptamin	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
HHL-Hormone (Oxytocin, Vasopressin, Adiuretin).	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+
Kallidin	—	+	—	—	+	+	—	+	+	+	—	+
Kallikrein	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—
Substanz P	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+
Substanz U	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—	—

* Ausgenommen während der Schwangerschaft.

** Wird in Gewebsextrakten zerstört.

+ aktiv, — inaktiv.

Substanz Z auf Stufe 10 durch Aceton abgetrennt. (Pharmakologische und chemische Unterscheidungsmerkmale für 5-Oxytryptamin und Substanz Z siehe Tab. 1 und 2.) Kallikrein¹¹ ist hochmolekular, thermolabil, sehr empfindlich gegen Lauge und Säure und zum Unterschied von der Substanz Z am isolierten Meerschweinchendarm unwirksam. Die von BUNDSCHUH⁵ im Harn nachgewiesene uteruserregende Substanz ist mit Oxytocin identisch, das wie das Vasopressin bei der Anreicherung der Substanz Z zerstört wird. Die im Harn nachgewiesene Substanz von WOLLHEIM^{14, 29}, die wahrscheinlich identisch ist mit der Substanz von LITTLE und GREEN^{13, 17}, senkt den Blutdruck, ist aber unwirksam an Darm und Uterus. Depressan ist im Gegensatz zur Substanz Z sehr empfindlich gegenüber NaOH und HCl und ist alkoholunlöslich.

Die von BERALDO³ im Hundeharn nachgewiesene darmerregende blutdrucksenkende Substanz U, wahrscheinlich auch ein Polypeptid, ist thermolabil und sehr lauge- und säureempfindlich. Durch Serum wird sie nicht inaktiviert, ist also gegen Substanz Z leicht abgrenzbar. Hypophysenhinterlappenhormone werden bei der Anreicherung der Substanz Z auf Stufe 7 durch Lauge quantitativ zerstört³⁰.

Unterschiede zwischen Substanz Z und den Hypophysenhinterlappenhormonen sind in Tab. 2 zusammengestellt. Vasopressin wird zum Unterschied zur Substanz Z durch Trypsin zerstört²⁶.

Zusammenfassung.

Es wird die Anreicherung einer neuen im menschlichen Harn vorkommenden blutdrucksenkenden, darm- und uteruserregenden Substanz beschrieben. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um ein Polypeptid. Die neue Substanz wird chemisch und pharmakologisch gegen Substanzen ähnlicher Wirkung abgegrenzt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Untersuchung ergebenst.

Herrn cand. med. A. BIER und Herrn cand. med. A. BUCHNER danken wir für ihre Hilfe bei der präparativen Gewinnung der Substanz Z und der Durchführung einiger pharmakologischer Bestimmungen.

Literatur.

- ¹ ANDRADE, S. O., C. R. DINIZ und M. ROCHA E SILVA: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 100 (1953). — ² VAN ARMAN, C. G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **79**, 356 (1952). — ^{3a} BERALDO, W. T.: Amer. J. Physiol. **171**, 371 (1952). — ^{3b} BERALDO, W. T.: XIX Intern. Physiol. Congr. 1953. Montreal. Abstracts of Comm., S. 203, und Symposium on Polypeptides 1953 Montreal. — ^{4a} BURN, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937. — ^{4b} BURN, G. P.: R. Singh Grewal. Brit. J. Pharmacol. **6**, 471 (1951). — ⁵ BUNDSCHUH, H. E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **195**, 631 (1940). — ⁶ CHANG, H. C., and J. H. CADDUM: J. of Physiol. **79**, 255 (1933). — ⁷ DALGLIESH, C. E., C. C. TOH and T. S. WORK: J. of Physiol. **120**, 298 (1953). — ⁸ ERSPAMER, V.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **196**, 343, 366, 391 (1940); **200**, 43, 60 (1942); **201**, 377 (1943). — Arch. Int.

Med. **90**, 505 (1952). — Il sistema cellulare enterocromaffine e l'enteramina, „Rendiconti Scientifica Farmitalia“, Vol. I (1954). — Nature (Lond.) **170**, 281 (1952). — Ric. Sci. **22**, 1 (1952). — Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 293 (1953). — ERSPAMER, V., u. A. OTTOLENGHI: *Experientia* (Basel) **6**, 428 (1950). — ^{9a} EULER, U. S. v., and J. H. GADDUM: *J. of Physiol.* **72**, 74 (1931). — ^{9b} EULER, U. S. v.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **181**, 181 (1936). — ¹⁰ FELDBERG, W., and C. C. TOH: *J. of Physiol.* **119**, 352 (1953). — ¹¹ FREY, E. K., H. KRAUT u. E. WERLE: Kallikrein (Padutin). Stuttgart: Ferdinand Enke 1950. — ¹² GADDUM, J. H., and H. SCHILD: *J. of Physiol.* **83**, 1 (1934). — ¹³ GREEN, H. D., J. M. LITTLE et comp.: *Circulation* (New York) **5**, 567 (1952). — ¹⁴ KAHLSON, G.: *Skand. Arch. Physiol.* (Berl. u. Lpz.) **77**, 271 (1937). — ¹⁵ KUMAGAI, H., S. EBESHI u. F. TAKEDA: *Jap. J. Pharmacol.* **2**, 65 (1952). — ¹⁶ KUCK, H., u. W. VOGT: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **209**, 71 (1950). — ¹⁷ LITTLE, M. J., H. D. GREEN and J. I. BUMGARNER: *Amer. J. Physiol.* **155**, 345 (1948). — ^{18a} NOBLE, R. L., R. RINDERKNECHT and P. C. WILLIAMS: *J. of Physiol.* **96**, 293 (1939). — ^{18b} NOBLE, R. L., and N. B. G. TAYLOR: *J. of Physiol.* **122**, 220 (1953). — ¹⁹ PERNOW, B.: *Acta physiol. scand.* (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — ²⁰ RAPPORT, M. M., A. A. GREEN and I. H. PAGE: *Science* (Lancaster, Pa.) **108**, 329 (1948). — *J. biol. Chem.* **174**, 735 (1948); **176**, 1237 (1948); **176**, 1243 (1948); **180**, 961 (1949). — RAPPORT, M. M., u. G. B. KOELLE: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **92**, 464 (1953). — ²¹ REID, G., and M. RAND: *Austr. J. Exper. Biol. a. Med. Sci.* **29**, 401 (1951). — *Nature* (Lond.) **167**, 801 (1952). — ^{22a} ROCHA E SILVA, M., and J. RIBIERO DO VALLE: *XIX Intern. Physiol. Congr. 1953. Montreal Abstr. of Comm.* S. 708. — ^{22b} ROCHA E SILVA, M.: *Bradicinina 1951 Sao Paulo*. — ^{22c} ROCHA E SILVA, M., W. T. BERALDO and G. ROSENFELD: *Amer. J. Physiol.* **156**, 261 (1949). — ^{22b} ROCHE E SILVA, M.: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **88**, 271 (1951). — ²³ SCHEID, G., u. E. S. HOROWICZ-ROSENFELD: *Praxis* (Bern) **42**, 992 (1953). — ²⁴ TWAROG, B. H., I. H. PAGE and H. BAILEY: *Amer. J. Physiol.* **175**, 157 (1953). — ²⁵ TAYLOR, N. B. G., and J. M. WALKER: *J. of Physiol.* **113**, 412 (1951). — ²⁶ VERZAR, F.: *Lehrbuch der inneren Sekretion*, S. 538. Liestal 1948. — ²⁷ VOGT, W.: *XIX Intern. Physiol. Congr. 1953. Montreal. Abstr. of Comm.* S. 858. — *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **216**, 203 (1952); **219**, 138 (1953); **209**, 221 (1949); **220**, 365 (1953). — ^{28a} WERLE, E., W. GÖTZE u. A. KEPPLER: *Biochem. Z.* **289**, 217 (1937). — ^{28b} WERLE, E., u. M. GRUNZ: *Biochem. Z.* **301**, 429 (1939). — ^{28c} WERLE, E., u. E. G. ERDÖS: *XIX Intern. Physiol. Congr. 1953. Montreal. Astr. of Comm.* S. 878. — ²⁹ WOLLHEIM, E.: *Acta med. scand.* (Stockh.) **91**, 1 (1937). — *Acta physiol. scand.* (Stockh.) **10**, 126 (1945). — ³⁰ *Brit. Pharmacopoeia* 1948.

Prof. Dr. E. WERLE, München, Laboratorium der Chirurgischen Universitäts-Klinik.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin (West).

Über protrahiert wirksame Gestagene*.

Von

KARL JUNKMANN**.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 9. Juni 1954.)

In einer vorangegangenen Mitteilung konnte über protahiert wirksame Androgene berichtet und das Problem von Depotpräparaten der Steroidhormone eingehend besprochen werden²⁶. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Ester des Testosterons sich als gut lösliche Stoffe mit Depotwirkung eignen. Die ausgedehnte und erfolgreiche klinische Anwendung, die inzwischen das Testosteronönanthas als Depotandrogen gefunden hat^{2, 3, 11, 15, 21, 22, 23, 24, 28, 31, 32, 33, 34, 42, 43, 45, 46, 47, 49, 51}, hat die damaligen Schlußfolgerungen gerechtfertigt. Anschließend konnte bei einer Untersuchung einer Reihe von Oestrogenestern das Oestradiolvalerianat als ein Oestrogen ausgewählt werden, dessen Wirkungsdauer und Wirkungsintensität etwa den Bedürfnissen des menschlichen Cyclus angepaßt waren²⁷. Auch dieses Präparat scheint inzwischen seine klinische Bewährungsprobe bestanden zu haben⁵⁰.

Da wegen der zeitlich besonders stark begrenzten Wirksamkeit des Progesterons gerade bei den Gestagenen der Wunsch nach einem Depotpräparat besonders lebhaft war, wurde eine Reihe von Verbindungen hinsichtlich der Dauer ihrer progestionalen Wirkung untersucht. Dabei sprach die Hoffnung mit, einige der Wünsche, die die Anwendung von Progesteronsuspensionen oder Tablettenimplantaten offen lassen, zu erfüllen. Über die Unzulänglichkeit der bisherigen Versuche zur Lösung der Frage nach Depotgestagenen hat sich HOHLWEG¹⁷ ausgesprochen.

Versuchsanordnung.

Zu den Versuchen dienten normale, jugendliche weibliche Kaninchen im Gewicht von 800—1200 g. Die Tiere erhielten zunächst durch 6 Tage täglich eine subcutane Injektion von 0,5 γ Östradiol in 1 cm³ Wasser. Am 7. Tage wurde die zu prüfende Substanz in 1 cm³ Sesamöl (notfalls als übersättigte Lösung) ebenfalls subcutan verabfolgt. Die Behandlung mit täglichen Östradiolgaben, von nun an mit

* Herrn Prof. Dr. ALFRED SCHITTENHELM zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Die untersuchten Substanzen wurden in der Abteilung Dr. SCHENCK des Hauptlaboratoriums der Schering A.G. von den Herren Dr. E. KASPAR und Dr. K. H. PAWLOWSKI und von Frau Dr. C. LOEWE synthetisiert. Bei der Durchführung der Versuche erfreute ich mich der Mitarbeit von Frl. M. ARNDT und Frau B. SUCHOWSKI.

0,05 γ , wurde bis zur Tötung der Tiere fortgesetzt. 3, 7, 10, 14, 17 und 21 Tage nach der Injektion des zu prüfenden Präparates wurden Tiere getötet und der Zustand der Schleimhaut an Gefrierschnitten nach Punkten bewertet. Dabei bedeutete

- 1 reine oestrogene Proliferation,
- 2 deutliche progestionale Umwandlung,
- 3 starke progestionale Umwandlung,
- 4 sehr starke progestionale Umwandlung.

Die Mittelwerte von 2—4 Tieren wurden der Beurteilung zugrundegelegt.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind der nachstehenden Tab. I zu entnehmen. In ihr sind auch die Schmelzpunkte der größtenteils noch nicht beschriebenen Verbindungen zusammengestellt und unter der Spalte „Literatur“ bei den schon bekannten die beschreibenden Arbeiten aufgeführt.

Aus ihr ist zu ersehen, daß die zunächst untersuchten Enolester des Progesterons gegenüber der freien Verbindung eine gewisse verlängerte Wirkungsdauer besitzen. Sie war jedoch in orientierenden klinischen Versuchen bei Verwendung von Gemischen der Enolester nicht ganz befriedigend. Anscheinend wird der auch beim Progesteron durch Veresterung grundsätzlich erzielbare Protraktionseffekt zum größten Teil durch die starke Empfindlichkeit der Enolester gegenüber O_2 wieder aufgehoben. Schon in vitro erweisen sich die Enolester des Progesteron stark oxydationsempfindlich, wobei 6 β -Oxyprogesteron und vorwiegend 3,6,20-Allopregnantrion gebildet werden³⁰. Da nach ihrer Verabfolgung beim Menschen eine Vermehrung der Pregnandiolausscheidung unterbleibt, ist es naheliegend anzunehmen, daß sie auch in vivo einer raschen Oxydation unter Bildung progestional unwirksamer Stoffwechselprodukte unterliegen.

Eine Anzahl weiterer Derivate des Progesteron kam teils wegen zu geringer Wirksamkeit oder wegen mangelnder Wirkungsdauer oder schlechter Löslichkeit nicht in eine engere Wahl.

Die Prüfung von drei 17-Estern des als peroral wirksames Gestagen bekannten 17- α -Äthinyltestosteron^{19, 20} ergab eine gewisse nicht sehr bedeutende Protraktion bei relativ schlechter Löslichkeit.

Einen wesentlichen Fortschritt erbrachte die Untersuchung der 17-Ester des 17 α -Oxyprogesteron, die sich überraschend stark gestagen wirksam zeigten, obwohl das freie 17 α -Oxyprogesteron, das bisher als progestional wirkungslos galt³⁶, auch in den eigenen Versuchen in einer Dosis von 10 mg nur schwache und kurze Wirksamkeit besaß. Schon das außerordentlich schwer lösliche Acetat fiel durch seine starke und lang anhaltende Wirkung auf. Die lange Wirkungsdauer dürfte hier im wesentlichen durch die schlechte Löslichkeit der aus der übersättigten Lösung in Sesamöl nach der Injektion ausfallenden Kristalle begründet sein. Die

Tabelle 1.

Präparat	Schmelzpunkt * Grad C	Lile- ratur	Ein- malige subc. Gabe mg/Tier	Uterusschleimhaut Tage nach der Injektion						
				3	7	10	13	17	20	
Progesteron	129,0—131,0		0,62	1,75						
			1,25	2,25	1,25	1,00				
			2,5	2,33	1,50	1,17				
			5,0	2,37	1,50	1,00	1,00			
			10,0	3,00	2,00	1,00	1,00			
			20,0		2,50	1,00	1,00			
Progesteron-3-enol-propionat	134,0—139,0	6, 48	5,0	2,50	1,75	1,00				
Progesteron-3-enol-n-butyrat	120,0—122,0	6, 48	5,0	1,50	2,00	1,50				
			10,0	3,00	2,00	1,50				
Progesteron-3-enol-n-valerianat	93,0—96,0		5,0	2,25	2,50	1,00	1,00			
			10,0	3,00	3,00	1,50	1,00			1,00
			5,0	2,75	3,00	1,00				
Progesteron-3-enol-i-valerianat	96,0—103,0		10,0	2,75	3,00	1,50	1,00			
			5,0	2,50	2,00	1,50				
Progesteron-3-enol-n-capronat	73,0—75,0		10,0	3,00	2,50	1,50	1,00			
			5,0	3,50	3,50	1,00				
Progesteron-3-enol-trimethylacetat	156,0—159,5		10,0	3,25	3,00	2,12	1,25	1,00		
			20,0	2,33	3,42	3,50	1,33	1,25		
Progesteron-3-enol-diäthylacetat	120,0—122,5		5,0	1,50	3,00	1,00				
			10,0	2,00	3,00	1,50	1,00			
Progesteron-3-enol-hexahydrobenzoat	152,0—155,0		5,0	2,00	2,50	1,00	1,00			
			10,0	3,00	3,00	1,50				
Progesteron-3-enol-benzoat	218,0—219,0	6	5,0	2,00	3,00	1,75	1,00	1,00		
Progesteron-3-enol-chloracetat	150,0—153,0		5,0	3,00	1,50	1,25	1,00			
			10,0	2,00	1,75	1,50	1,00			

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Präparat	Schmelzpunkt * Grad C	Literatur	Einmalige subc. Gabe mg/Tier	3	7	10	13	17	20
Progesteron-3-enol-p-chlorbenzoat	220,0—225,0		5,0	3,00	1,50	1,25	1,00		
Progesteron-3-enol-benzyläther.	187,0—189,0		10,0	2,00	2,75	1,50	1,00		
Progesteron-20-äthylenketal	189,0—191,0		10,0	2,67	1,75	1,00			
Progesteron-3-oxim.	246,0—248,0		20,0	2,00	1,00	1,00			
Progesteron-20-oxim	212,0—214,0		10,0	3,00	1,00	1,00			
Progesteron-20-oximacetat	156,0—157,5		20,0	1,67	1,00			1,00	
Progesteron-20-oxim-n-butyrat.	114,0—115,0		10,0	2,25	1,00	1,00			
3-N-Phenylimino-14-pregnen-20-on.	209,0—211,0		10,0	3,25	3,00	1,50	1,00		
			20,0	2,00	3,00	1,50	1,00		
16-Chlor-progesteron	176,5—178,5 Z		10,0	2,00	2,25	1,00			
16-Brom-progesteron	160,0—161,0 Z		10,0	1,75	1,00	1,25	1,00		
17-α-Athinyltestosteron-17-acetat	158,0—159,0		20,0	3,00	1,75	1,00			
17-α-Athinyltestosteron-17-butyrat	152,0—153,0		20,0	3,00	3,00	1,50	1,00		
17-α-Athinyltestosteron-17-önanthat	133,0—135,0		20,0	2,00	3,00	1,50	1,00		
17-α-Oxyprogesteron	213,0—214,0	4, 7, 9, 25, 29, 36, 38, 40	10,0	1,50	1,25	1,00			
		7, 44						1,00	
17-α-Oxyprogesteron-17-acetat	239,0—240,0		5,0	1,75	4,00	3,00	1,00		
			10,0	2,66	3,38	3,13	2,00	2,00	1,75
			20,0	2,98	3,38	3,00	2,00		
			5,0	2,00	2,00	1,00			
17-α-Oxyprogesteron-17-propionat	160,0—162,5		10,0	3,00	2,50	1,00		1,00	
			20,0	2,25	2,50	1,50	1,00		

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Präparat	Schmelzpunkt* Grad C	Liti- ratur	Ein- malige subc. Gabe mg/Tier	Uterusschleimhaut Tage nach der Injektion						
				8	7	10	13	17	20	
17- α -Oxyprogesteron-17-n-butyrat	123,5- 124,5		10,0	3,00	3,00	1,50	1,25	1,00		
17- α -Oxyprogesteron-17-n-valerianat	139,0-142,0		20,0	2,50	3,00	2,16	1,00	1,16		
			5,0	2,00	3,00	1,50				
			10,0	2,75	3,00	3,00	1,75			
17- α -Oxyprogesteron-17-n-capronat	120,0-121,0		20,0	2,00	2,50	2,75	1,50			1,25
			0,16							
			0,31	2,25	1,75	1,00				
			0,63	3,00	3,25	1,50				
			1,25	2,67	3,50	1,00	1,00	1,00		
			2,50	2,00	3,00	1,75	1,25	1,00		
			5,0	2,00	3,50	2,50	1,50	1,50		
			10,0	2,75	3,00	2,75	1,50	1,50		
			20,0	2,50	2,75	2,55	1,75	1,33		
17- α -Oxyprogesteron-17-n-önanthant	114,0-115,0		10,0	3,00	3,25	1,50	1,00			
			20,0	3,00	3,00	3,00	1,62	1,00		
			10,0	2,50	1,50	1,00				
17- α -Oxyprogesteron-17-n-caprylat	75,0- 75,5		10,0	2,00	1,25	1,00				
17- α -Oxyprogesteron-17-n-caprinat	etwa 30,0		10,0	2,00	1,25	1,00				
17- α -Oxyprogesteron-17-n-undecylat	69,0- 72,0		10,0	1,75	1,00					
17- α -Oxyprogesteron-17-diäthylacetat	155,0- 156,5		10,0	2,50	2,25	1,50	1,00			
17- α -Oxyprogesteron-3-enolacetat-17-acetat	201,0-205,0	35	10,0	1,00	1,25	1,00				
17- α -Oxyprogesteron-16-chlor-17-acetat	202,0-204,0 Z		10,0	3,00	1,25	1,00				
16,17-Epoxyprogesteron	203,0-205,0	25	10,0	1,75	1,00	1,25	1,00			
17- α -Oxy-16-chlor-progesteron	186,0-187,0		10,0	1,25	1,00	1,00	1,00			

* Alle Schmelzpunkte unkorrigiert in offenem Röhrchen genommen. Etwa 20° C unter dem Schmelzpunkt eingesetzt. Temperatursteigerung 4° C pro Minute.

Wirkungsdauer nimmt beim Propionat gegenüber dem Acetat wieder ab und steigt dann über das Butyrat und Valerianat zum Capronat zu einem neuerlichen Optimum an, um über das Önanthat, Caprylat, Caprinat zum Undecylat wieder abzusinken. Glücklicherweise war das 17- α -Oxyprogesteron-n-capronat in einem Gemisch von Ricinusöl und Äthyllactat, das reizlos bei Mensch und Tier injizierbar war, ausreichend löslich, um therapeutisch wirksame Mengen beim Menschen in Form klarer Lösungen anzuwenden. Inzwischen von BOSCHANN¹ durchgeführte klinische Versuche stellten die Möglichkeit unter Beweis, mit 2 im Abstand von 8 Tagen verabfolgte Injektionen von je 125 mg 17- α -Oxyprogesteron-capronat in 1 cm³ Ricinusöl-Äthyllactat-Gemisch eine sekretorische Umwandlung der Uterusschleimhaut bei der kastrierten Frau auszulösen.

Das freie 17- α -Oxyprogesteron (Nomenklatur nach FIESER¹⁰), früher als 17- β -Oxyprogesteron bezeichnet, wurde von PFIFFNER und NORTH³⁶ sowie von v. EUW und REICHSTEIN⁹ aus der Nebennierenrinde isoliert und galt als schwach wirksames Androgen. Es soll an der infantilen, kastrierten Ratte eine androgene Wirkung besitzen und Samenblasen- und Prostatawachstum anregen^{38, 4}. Intramuskulär am Kapaun soll es halb so wirksam wie Androsteron hinsichtlich des Kammwachstums sein⁴⁷. Ebenso soll es bei lokaler Anwendung am Kapaunenkamm androgen wirksam sein⁴.

In eigenen Versuchen an normalen, infantilen Ratten hatte das freie 17- α -Oxyprogesteron keine androgene Wirkung an Samenblasen und Prostata. Dabei wurden Tagesgaben bis zu 1 mg durch 14 Tage an 35—45 g schwere Ratten gegeben. Auch DOREMAN⁸ konnte sich nicht von einer androgenen Wirkung des 17- α -Oxyprogesteron überzeugen.

Das 17- α -Oxyprogesteron-17-capronat läßt an kastrierten Ratten in Tagesgaben von 1—1000 γ durch 14 Tage subcutan verabreicht ebenfalls eine androgene Wirkung vermissen. Vgl. Tab. 2.

Tabelle 2.

	Tagesdosis γ	Tiergewicht g am		Organgewicht mg/100 g					
		Versuchsbeginn	Versuchsende	Thymus	Niere	Nebenniere	Samenblasen	Prostata	Levator ani
Ratten ♂ kastriert. 8 Tage	1000	89	126	318	1038	37	13	11	19
anach Beginn der Behandlung	100	90	126	284	968	36	17	14	19
mit täglichen subcutanen Injektionen von 17-	10	89	124	296	1155	43	18	14	20
Oxyprogesteron-17-capronat durch 14 Tage	1	92	124	245	1077	38	15	16	24

Das Wachstum der Tiere wurde nicht beeinflusst. Als einzige Veränderung fielen jedoch die relativ hohen Gewichte des Thymus auf.

In Tab. 3 sind die Wirkungen der einmaligen subcutanen Injektion von 20 mg 17- α -Oxyprogesteron-capronat an männlichen, kastrierten Ratten, an normalen männlichen, eben geschlechtsreifen Ratten und an

normalen männlichen infantilen Ratten zusammengestellt. Auch hier fehlt bei allen 3 Tiergruppen ein androgener Effekt an Samenblasen, Prostata und Levator ani. Ein Einfluß auf das Thymusgewicht ist hier nur bei den infantilen Tieren deutlich, bei den Kastraten höchstens angedeutet. Das Wachstum der Tiere und die Entwicklung der Gonaden und sekundären Geschlechtscharaktere der infantilen Tiere können als normal bezeichnet werden. Allen Zahlenangaben der Tab. 2 und 3 liegen Mittelwerte von je 5 Tieren zugrunde.

Tabelle 3.

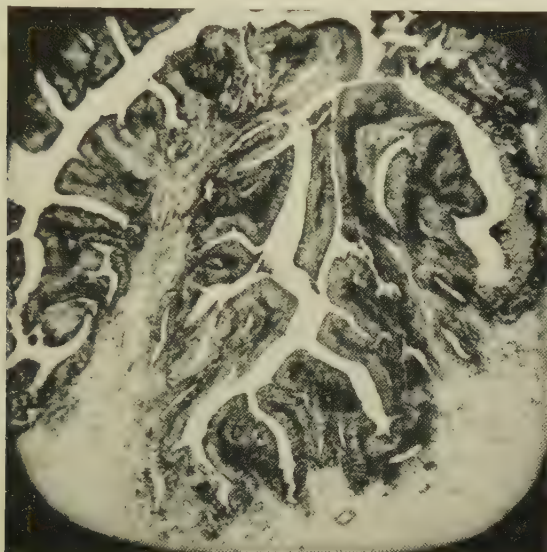
	Wochen nach der Injek- tion	Tiergewicht g am		Gewicht der frischen Organe mg/100 g						Lo t
		Ver- suchs- beginn	Ver- suchs- ende	Thy- mus	Niere	Neben- niere	Hoden	Samen- blasen	Pro- stata	
Ratten ♂ 80—100 g erhalten eine Woche nach der Kastration einmalig 20 mg 17- α -Oxyprogesteron-17-capronat subcutan in 0,5 cm ³ Sesamöl	1	112	129	218	985	31		32	12	
	2	111	127	159	1061	38		38	13	
	3	112	155	207	917	26		18	8	
	4	109	169	240	902	22		21	27	
	5	110	176	183	786	29		18	25	
Ratten ♂ infantil erhalten einmalig die gleiche Dosis subcutan in 0,5 cm ³ Sesamöl	1	41	66	263	1167	40	662	19	57	
	2	51	81	270	1119	51	899	32	56	
	3	43	84	286	1290	46	1543	42	68	
	4	42	115	234	1069	30	1600	83	81	
	5	43	130	195	1086	29	1342	102	142	
	6	39	122	208	1068	29	1545	190	138	
Ratten ♂ normal erhalten einmalig die gleiche Dosis subcutan in 0,5 cm ³ Sesamöl	1	100	120	212	1021	28	1422	132	101	
	2	98	136	144	962	31	1343	253	157	
	3	92	141	169	956	31	1154	252	168	
	4	100	164	197	957	27	1137	198	179	

Die Gestagenwirkung des 17- α -Oxyprogesteron-capronat am Kaninchen-Uterus wurde außer in den schon in Tab. 1 angeführten Versuchen auch noch mit der von HOHLWEG modifizierten Auswertungstechnik⁵ bestimmt. Zur Klassifizierung des Zustandes der Uterusschleimhaut wurde jedoch das gleiche Punktsystem wie in Tab. 1 benutzt. Das Ergebnis ist in Tab. 4 wiedergegeben.

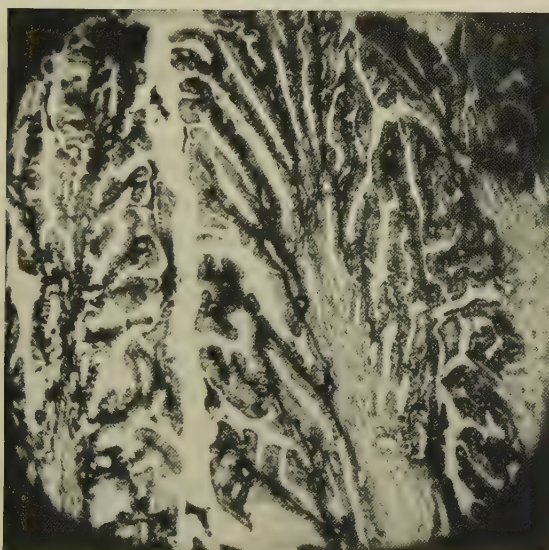
Tabelle 4. Infantile Kaninchen 6 Tage mit tägl. 0,5 γ Oestradiol in cm³ Wasser subcutan vorbehandelt.

Gesamtdosis 17 α -Oxyprogesteron-capronat auf 5 Tage verteilt subcutan in mg pro Tier	Zustand der Uterusschleimhaut 24 Stunden nach der letzten Injektion
0,2	1,00
0,4	1,17
0,8	2,17
1,6	2,81
3,2	2,00

Die wirksame Grenzdosis liegt bei dieser Auswertungstechnik etwa wie beim Progesteron zwischen 0,4 und 0,8 mg, während bei dem in Tab. 1 durchgeführten Vergleich zwischen einmaligen Injektionen von



Nach 3 Tagen.



Nach 7 Tagen.

Abb. 1. Ausschnitt aus der Uterusschleimhaut des Kaninchens nach einmaliger Injektion von 17- α -Oxyprogesteron-capronat. Phosphatasefärbung nach GOMORI.

Progesteron und 17- α -Oxyprogesteron-capronat das letztere nicht nur deutlich länger, sondern auch stärker wirksam ist.

Als weitere Kriterien der Gelbkörperwirkung des 17- α -Oxyprogesteron-capronats lassen sich in der Uterusschleimhaut auch die vermehrte Glykogeneinlagerung (Färbung nach BEST) und die starke Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Technik vgl.^{12, 13, 14}) sowohl in den Epithelien als auch besonders in der Submucosa der feineren Schleimhautfalten nachweisen. Die Intensität dieser Wirkungen geht durchaus parallel dem Differenzierungsgrad der Schleimhaut, der bei Einzelgaben von 2,5—200 mg pro Tier seinen Höhepunkt zwischen 7. und 10. Tag nach der Injektion erreicht. Vgl. Abb. 1.

Hinsichtlich der Veränderungen des 17- α -Oxyprogesteron und seines Capronats im Stoffwechsel des Menschen sei auf die nachstehende Veröffentlichung von H. LANGECKER und W. PRESCHER verwiesen.

Somit scheint im 17- α -Oxyprogesteron-capronat ein Stoff gefunden zu sein, dem die charakteristischen Wirkungen des Gelbkörperhormones zukommen. Die Substanz zeichnet sich darüber hinaus durch eine ausgesprochen lange Wirkungsdauer aus und ist bei Vergleich einmaliger Injektionen auch hinsichtlich der Wirkungsintensität dem Progesteron überlegen. Es soll hier nicht versucht werden, eine Erklärung für die lange Wirkungsdauer zu geben. Da jedoch das freie 17- α -Oxyprogesteron nur ganz schwach progestional wirksam ist, scheint für das Capronat eine der bei den protrahiert wirksamen Androgen- und Östrogenestern diskutierten Möglichkeiten, nämlich die langsame Verseifung (am Injektionsort oder nach Resorption und Verteilung im Körper) und damit das langsame Freiwerden der eigentlich wirksamen Verbindung auszuschneiden.

Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung einer größeren Reihe von Pregnanderivaten erweisen sich die Ester des 17- α -Oxyprogesteron, das selbst nur ganz schwache Gelbkörperwirkung besitzt, als starke und darüber hinaus protrahiert wirksame Gestagene. Ein Optimum von Wirksamkeit, Wirkungsdauer und Löslichkeit liegt beim 17- α -Oxyprogesteron-n-capronat. Mit ihm ist daher die Anwendung wirksamer Depotgaben beim Menschen in klarer Lösung möglich. Androgene Nebenwirkungen fehlen in dem hier untersuchten Gabenbereich sowohl dem freien 17- α -Oxyprogesteron als auch seinem Capronat. Ebenso wurden keine Wachstumswirkungen und keine Beeinflussung der Entwicklung der sekundären Geschlechtscharaktere bei der infantilen und adulten, kastrierten, männlichen Ratte beobachtet. Die 3-Enolester des Progesteron erwiesen sich, obwohl ihnen eine gewisse verlängerte Wirkungsdauer eigen ist, vermutlich wegen ihrer leichten Oxydierbarkeit in vitro und in vivo als weniger gut geeignete Depotgestagene.

Literatur.

- ¹ BOSCHANN, H. W.: *Ärztl. Wschr.* **1954**, 591. — ² BUBENHEIM, H.: *Med. Klin.* **1953**, 1632. — ³ BUSCHBECK, H.: *Therapiewoche* **3**, 1/2, 10 (1952/53); **3**, 9/10, 197 (1952/53). — Ref. *Ber. Gynäk.* **49**, 3/4, 157 (1953). — ⁴ BUTENANDT, A.: *Naturwissenschaften* **30**, 4 (1942). — ⁵ BUTENANDT, A., U. WESTPHAL u. W. HOHLWEG: *H.* **227**, 84 (1934). — ⁶ CIBA A.G.: *Engl. P.* 477 400 C, 120 (1938). — ⁷ CIBA A.G.: *Schweiz. P.* 228 644 (1943); C, 1300 (1944); A.P. 2. 365 292; *Schweiz. P.* 234 923 (1945); C.A. **43**, 6248a (1949). — ⁸ DORFMAN, R. I.: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **73**, 223 (1950). — ⁹ EUW, J., VAN, u. T. REICHSTEIN: *Helvet. chim. Acta* **24**, 879 (1941). — ¹⁰ FIESER, L. P., and M. FIESER: *Natur. Prod. Relat. to Phenanthren III.* New York: Reinhold Publ. Corp. 1949. — ¹¹ GEIGER, H.: *Med. heute* **10**, 27—31 (1953). — ¹² GOMORI, G.: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **42**, 23—26 (1939). — ¹³ GOMORI, G.: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **17**, 70—83 (1941a). — ¹⁴ GOMORI, G.: *Arch. of Path.* **32**, 189—199 (1941b). — ¹⁵ HAGEDORN, H.: *Medizinische (Stuttgart)* **45**, 1422 (1952). — ¹⁶ HEGNER, P., u. T. REICHSTEIN: *Helvet. chim. Acta* **24**, 828 (1941). — ¹⁷ HOHLWEG, W.: In L. SEITZ u. A. J. AMREICH: *Hdb. d. Biologie u. Pathologie d. Weibes*, 2. Aufl. **1**, 591. München: Urban u. Schwarzenberg 1953. — ¹⁸ INGLE, D. J.: *Endocrinology* **30**, 246 (1942). — ¹⁹ INHOFFEN, H. H., u. W. HOHLWEG: *Naturwissenschaften* **6**, 96 (1938). — ²⁰ INHOFFEN, H. H., W. LOGEMANN, W. HOHLWEG u. A. SERINI: *B.* **71**, 1024 (1938). — ²¹ JESSERER, H.: *Z. Rheumaforsch.* **12**, 9/10, 261 (1953). — ²² JESSERER, H., u. W. HÖRTNAGEL: *Wien. klin. Wschr.* **1954**, 10. — ²³ JORES, A.: *Augsburger Fortbildungstage für prakt. Medizin*, 1953, S. 11. — ²⁴ JORES, A.: *Medizinische (Stuttgart)* **33/34**, 1066 (1953). — ²⁵ JULIAN, P. L., E. W. MEYER and J. RYDEN: *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 367 (1950). — ²⁶ JUNKMANN, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **215**, 85 (1953). — ²⁷ JUNKMANN, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **220**, 358 (1953). — ²⁸ KRESS, H., Frh. v.: *Ärztl. Wschr.* **1954**, 303. — ²⁹ KRITCHEVSKY, TH., and T. F. GALLAGHER: *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 184 (1951). — ³⁰ LOEWE, C.: Unveröffentlicht. — ³¹ MEYTHALER, F., u. F. HÄNDEL: *Ther. Gegenw.* **1952**, 304. — ³² MEYTHALER, F., u. F. HÄNDEL: *Münch. med. Wschr.* **1952**, 2526. — ³³ MITTELSTRASS, H.: *Dtsch. med. Wschr.* **1953**, 1729. — ³⁴ MOENCH, A., u. H. SARTORIUS: *Klin. Wschr.* **1954**, 329. — ³⁵ MOFFETT, R. B., and H. V. ANDERSON: *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 747 (1954). — ³⁶ PFIFFNER, J. J., and H. B. NORTH: *J. of Biol. Chem.* **132**, 459 (1940). — ³⁷ PFIFFNER, J. J., and H. B. NORTH: *J. of Biol. Chem.* **132**, 461 (1940). — ³⁸ PFIFFNER, J. J., and H. B. NORTH: *J. of Biol. Chem.* **139**, 855 (1941). — ³⁹ PRINS, D. A., u. T. REICHSTEIN: *Helvet. chim. Acta* **24**, 945 (1941). — ⁴⁰ ROSENKRANZ, G., J. P. ST. KAUFMANN, J. BERLIN and C. DJERASSI: *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 4081 (1950). — ⁴¹ SCHERER, E.: *Strahlenther.* **93**, 4, 509 (1954). — ⁴² SCHNEIDER, J. A.: *Ärztl. Wschr.* **1952**, 381. — ⁴³ SCHNEIDER, J. A., u. A. SCHUCHTER: *Ärztl. Wschr.* **1954**, 392. — ⁴⁴ TURNER, R. B.: *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 3489 (1953). — ⁴⁵ VASTERLING, H. W.: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 1222. — ⁴⁶ VOLHARD, J.: *Medizinische (Stuttgart)* **9**, 290 (1954). — ⁴⁷ WEISSBECKER, L.: *Dtsch. med. Wschr.* **1954**, 833. — ⁴⁸ WESTPHAL, U.: *Chem. Ber.* **70**, 2129 (1937). — ⁴⁹ WIED, G. L.: *Zbl. Gynäk.* **75**, 40, 1578 (1953). — ⁵⁰ WIED, G. L.: *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **14**, 1, 45 (1954). — ⁵¹ WILBERG, CHARL.: *Therapiewoche* **3**, 19/20, 475 (1953).

Prof. Dr. KARL JUNKMANN, Hauptlab. d. Schering A.G., Berlin-West.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. KUSCHINSKY).

Ein isoliertes Nerv-Muskelpräparat des *M. serratus* der Ratte.

Von

HEINZ LÜLLMANN und HELMUTH BRUNNER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Juni 1954.)

Das Phrenicus-Zwerchfell-Präparat nach BÜLBRING hat sich in vielen Untersuchungen sehr gut bewährt. Wenn wir trotzdem nach einem weiteren Nerv-Muskelpräparat gesucht haben, so waren dafür folgende Gründe bestimmend:

a) Die Verallgemeinerungsfähigkeit von Befunden, die nur durch eine experimentelle Anordnung gewonnen wurden, ist weniger groß als die von Resultaten, die unter verschiedenen Bedingungen erhalten worden sind.

b) Das Zwerchfell nimmt dank seiner physiologischen Aufgabe unter den Skelettmuskeln eine Sonderstellung ein (RIESSER). Das besondere Verhalten des Rattendiaphragma wird vor allem nach Durchschneidung des Nervus phrenicus deutlich. SOLA und MARTIN zeigten die Ausbildung einer Hypertrophie nach Phrenicus-Exhärese. Die sonst in der Skelettmuskulatur auftretende Gewichtsminderung nach Denervierung beginnt sich erst 6—8 Wochen nach dem Operationstermin abzuzeichnen. Wir konnten diese Befunde bestätigen (KUSCHINSKY, MUSCHOLL u. LÜLLMANN).

c) Es ist unmöglich, eine Tenotomie des Zwerchfells durchzuführen.

Die Mitteilung von JENDEN, KAMIJO und TAYLOR über ein neues Nerv-Muskelpräparat (Mm. lumbricales des Kaninchens mit zugehörigem Nerv) zeigt das Interesse an einem zusätzlichen Versuchsobjekt. An ein solches Präparat sind eine Anzahl von Forderungen zu stellen, die erfüllt sein müssen, damit ein erfolgreiches Experimentieren gewährleistet ist: Die Schichtdicke des Muskels muß gering sein, um den Stoffaustausch zwischen Organ und Badflüssigkeit zu ermöglichen, der versorgende Nerv muß leicht aus dem Gewebe herauszupräparieren sein und eine bestimmte Mindestlänge aufweisen; schließlich soll der Muskel mit seinem Ursprung und Ansatz so gebildet sein, daß eine Halterung im Organbad und die Anbringung der zwei Elektrodenpaare an Muskel und Nerv ohne größere Schwierigkeiten zu bewerkstelligen ist. Wir glauben,

in dem caudalen Teil des *M. serratus lateralis* (s. anterior) mit dem zugehörigen Nervus thoracicus longus ein solches Organ gefunden zu haben und teilen deshalb die Präparation und einige Befunde mit.

Methodik.

Präparation. Ratten im Gewicht von 120—150 g wurden durch Genickschlag getötet. Das Fell der Tiere wurde von der Regio umbilicalis



Abb. 1. Präparation des re. *M. serratus lat.*: Der caudale Abschnitt des Muskels mit dem *N. thoracicus longus*.

bis zum Halse median durchtrennt, darauf einseitig zurückpräpariert unter Einschluß des proximalen Abschnittes der vorderen Extremität. Der *M. latissimus dorsi* wurde nach Eingehen an seinem ventralen Rand dorsalwärts geschoben und seine Ansatzsehne möglichst nahe dem Humerus durchtrennt. Nach Ausräumung der Achselhöhle wurde der *M. pectoralis major* durchschnitten. Durch Abklappen der Scapula nach dorsal kann der *M. serratus lateralis* ausgespannt werden (Abb. 1).

Der *M. serratus lateralis* besteht aus zwei Anteilen: einem cranialen flächenhaften und 3—4 caudalen Muskelzacken, die getrennt zu den Rippen ziehen und hier mit den oberen Muskelzacken des *M. obliquus abd. externus* interferieren. Der versorgende Nerv (*N. thoracicus longus*) zieht auf der thorakalen Seite des Muskels schräg über seinen flächenhaften Anteil zum caudalen Abschnitt. In proximaler Richtung verschwindet der *N. thoracicus longus* unter dem *M. pectoralis minor*.

Für das Nerv-Muskelpräparat wurden die caudalen 3—4 Muskelzacken des *M. serratus lateralis* verwendet. Die interferierenden Teile des

M. obliquus abd. ext. wurden entfernt, so daß der Ursprung des *M. serratus lat.* frei lag. Darauf wurde der *N. thoracicus longus* präpariert, angeschlungen und unter dem *M. pectoralis minor* durchgeschnitten. Nach stumpfer Abtrennung der unteren Muskelzacken vom flächenhaften Teil des *M. serratus lat.* erfolgte die Isolierung des Präparates aus dem Tierkörper. Die Scapulaspitze, die den Ansatz des Muskels trägt, wurde von der Scapula abgeschnitten und der Thoraxwandabschnitt, von dem der Muskel entspringt, herauspräpariert. Der Muskel wurde im Bad durch Einklemmen des Rippenbogens in einem Plexiglasschuh und Anschlingen der Scapulaspitze mit einem Faden fixiert.

Denervierung. Die Ratten wurden mit 150 mg N-methylcyclohexenylmethylbarbitursäurem Natrium¹/kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. Nach Schnittführung entlang der vorderen Axillarfalte wurde eingegangen und die Scapula nach dorsal abgedrängt. Da sich dabei der craniale Teil des *M. serratus lat.*, auf dem der *N. thoracicus longus* entlangläuft, ausspannt, konnte der Nerv dann leicht gefaßt und durchtrennt werden. Zur Vermeidung einer Regeneration ist es notwendig, ein längeres Stück dieses Nerven zu entfernen. Der Hautschnitt wurde nach Einbringung von etwas Penicillinpulver mit einigen Nähten geschlossen.

Tenotomie. Das operative Vorgehen glich dem bei der Denervierung. Statt der Nervendurchtrennung wurde der *M. serratus lat.*, an seinem Ansatzpunkt, dem *Angulus caudalis scapulae*, durchgeschnitten.

Bad- und Reizbedingungen. Als Badflüssigkeit diente Tyrodelösung folgender Zusammensetzung: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g CaCl₂, 0,1 g MgCl₂, 1,0 g NaHCO₃, 0,05 g NaH₂PO₄, 2,0 g Glucose, Aqua destillata ad 1000,0 cm³. Durch das Bad wurde feinblasig ein Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ geleitet. Als optimal erwies sich eine Badtemperatur von 30° C. Die direkte Muskelreizung erfolgte durch zwei parallel beiderseits des Muskels gelegene Platinstifte, die indirekte mittels einer Schnabel-elektrode, in der der *N. thoracicus longus* zwei Platindrähten anlag. Ein Rechteckimpuls-generator lieferte Impulse mit folgenden Daten: Reizstärke supramaximal. Impulsdauer 2 msec. Frequenz variabel. Die Muskelzuckungen werden isotonisch auf dem Rußkymographion registriert.

Versuchsergebnisse.

Unter den angegebenen Bedingungen entwickelte der direkt oder indirekt gereizte *M. serratus lat.* (caudaler Teil) während einer einzelnen Kontraktion etwa 2 g Spannung bei einer Vorspannung von ebenfalls 2 g. Die Zuckungshöhe der Präparate nahm pro Stunde um etwa 10% ab.

Wir untersuchten die Empfindlichkeit des *M. serratus lat.* gegenüber d-Tubocurarin² und Dekamethonium² (Abb. 2). Folgende Konzentrationen wurden benötigt, um eine 80% Abnahme der Hubhöhe bei indirekter Reizung zu erzeugen: für d-Tubocurarin 5×10^{-7} g/cm³ (aus Versuchen an 8 Muskeln) und für Dekamethonium 4×10^{-6} g/cm³ (aus

¹ Wir danken der Firma Bayer, Leverkusen, für die Überlassung von Evipan.

² Wir danken den Firmen Asta-Werke, Brackwede, Cassella-Farbwerke, Frankfurt, und Hoffmann La Roche, Grenzach, für die Überlassung der Versuchsmengen von d-Tubocurarin, Dekamethonium und Acetylcholin.

Versuchen an 14 Muskeln). Ein Vergleich dieser Werte mit denjenigen, die von uns am Phrenicus-Zwerchfellpräparat gewonnen wurden, zeigt eine vierfach stärkere Empfindlichkeit des *M. serratus lat.* auf Dekamethonium.

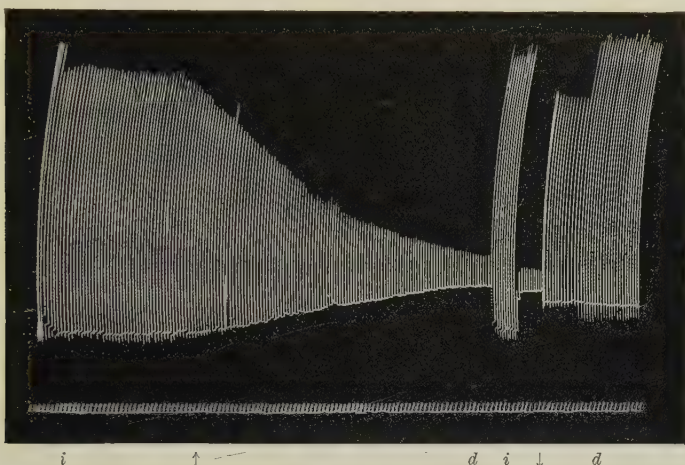


Abb. 2. Isolierter *M. serratus lat.*, indirekte Reizung über den *N. thoracicus longus*. Reizung: Impulsdauer 2 msec, Intensität supramaximal, Frequenz 3/min. *i* indirekte, *d* direkte Reizung.
 ↑ d-Tubocurarin. hydrochlor. 3×10^{-7} g/cm³ ↓ 3 × Auswaschen. Zeitschreibung 30 sec.

methonium, während von d-Tubocurarin gleiche Mengen benötigt wurden, um eine 80% Abnahme der Hubhöhe zu erzwingen.

Im Gegensatz zu den Befunden am Zwerchfell trat nach Denervierung des *M. serratus lat.* sogleich eine Atrophie des Muskels auf. 14 Tage nach Durchtrennung des *Nerv. thoracicus longus* war das Gewicht des *M. serratus lat.* (unterer Abschnitt) im Durchschnitt um 50% im Vergleich zur contralateralen Seite abgesunken. Acetylcholin¹ (10^{-4} — 10^{-5} g/cm³) rief in diesem Stadium eine Kontraktur des Muskels hervor (Abb. 3). Unter denselben Versuchsbedingungen verursachte Dekamethonium (10^{-4} — 10^{-6} g/cm³) eine Abnahme der Hubhöhe. Beide Effekte waren reversibel.

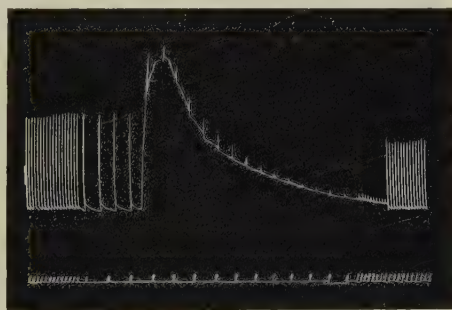


Abb. 3. Isolierter *M. serratus lat.* 3,5 Wochen vor dem Versuch denerviert. Technische Daten wie Abb. 2.
 ↑ Acetylcholin. hydrochlor. 10^{-5} g/cm³
 ↓ 3 × Auswaschen.

¹ Wir danken den Firmen Asta-Werke, Brackwede, Cassella-Farbwerte, Frankfurt, und Hoffmann La Roche, Grenzach, für die Überlassung der Versuchsmengen von d-Tubocurarin, Dekamethonium und Acetylcholin.

Der tenotomierte *M. serratus lat.* atrophiierte ebenso wie der denervierte Muskel. Auf die genannten Pharmaka reagierte er wie ein normaler Muskel.

Einen Unterschied zwischen dem *M. serratus lat.* und dem Diaphragma im Hinblick auf die Tetanisierbarkeit konnte von uns nicht festgestellt werden. Ein vollstündiger Tetanus trat an den zwei Muskeln bei Reizfrequenzen von 25—30 Hz auf.

Beide Muskeln wurden von uns histologisch untersucht (HEIDENHEINSches Hämatoxylin nach SUSA-Fixierung). Wenn wir uns der Nomenklatur von KRÜGER bedienen, so lassen sich im Rattenzwerchfell zwei Faserarten (Fasern mit „Fibrillenstruktur“ und Fasern mit „Felderstruktur“) unterscheiden. Wir können damit den Befund von GÜNTHER, auch hinsichtlich der prozentualen Anteile, bestätigen. Während das Diaphragma etwa 40% „felderstrukturierte“ Fasern aufweist, bestand der von uns untersuchte caudale Abschnitt des *M. serratus lat.* lediglich aus einer Faserart, den „fibrillenstrukturierten“ Fasern. Diesem morphologischen Unterschied im Aufbau entsprach unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen kein funktioneller, wenn man von der etwas größeren Empfindlichkeit des *M. serratus lat.* gegenüber Dekamethonium absieht.

Zusammenfassung.

Es wird über ein neues Nerv-Muskelpreparat der Ratte, das aus dem *N. thoracicus longus* und dem *M. serratus lat.* besteht, berichtet und dessen Präparation dargestellt. Die Reaktionen auf Acetylcholin, d-Tubocurarin und Dekamethonium unter normalen Bedingungen, nach „chronischer Denervierung“ und nach Tenotomie werden mitgeteilt. Obgleich histologisch zwischen *M. serratus lat.* und dem Diaphragma der Ratte Unterschiede bestehen, gleichen sich die Reaktionen der beiden Muskeln auf die genannten Pharmaka und auf tetanische Reizung.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur.

BÜLBRING, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — GÜNTHER, P. G.: Acta anat. (Basel) **14**, 54 (1952). — JENDEN, D. J., K. KAMIJO and D. B. TAYLOR: Nature (Lond.) **168**, 880 (1951). — KUSCHINSKY, G., E. MUSCHOLL u. H. LÜLLMANN: In Vorbereitung. — KRÜGER, P.: Tetanus und Tonus des quergestreiften Skelettmuskels der Wirbeltiere und des Menschen. Leipzig: Akadem. Verlagsgesellschaft 1952. — RIESSER, O.: Muskelpharmakologie. S. 41. Bern: Hans Huber 1949. — SOLA, O. M., and A. W. MARTIN: Amer. J. Physiol. **172**, 324 (1953).

Dr. H. LÜLLMANN, Mainz, Pharm. Inst. d. Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

Versuche zum Lichteinfluß auf die jahreszeitliche Oestrusperiodizität.

Von

K. REPKE und F. MARKWARDT.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 8. Juni 1954.)

Die regulierende Wirkung des Lichts auf die jahreszeitliche Sexualperiodizität ist durch eine große Zahl sorgfältiger Untersuchungen gesichert.

ROWAN⁵³ zeigte als erster, daß Vögel, die sonst nur im Frühjahr zu brüten pflegen, ihr Brutgeschäft mitten im Winter aufnehmen, wenn das spärliche Licht der kurzen Wintertage durch künstliche Beleuchtung ergänzt wird. Diese Befunde wurden durch andere Forscher bestätigt^{6, 7, 11, 18, 38, 57, 59} und der Einfluß des Lichts auch bei einigen weiteren Tierarten, verschiedenen Säugern^{4, 12, 29, 44} und Fischen³⁷, festgestellt. Beim Menschen tritt die Lichtwirkung unter den extremen Licht-Dunkelheit-Bedingungen, wie sie in der Nähe der Erdpole herrschen, deutlich hervor. Nach COOK¹⁹ besteht bei den Eskimos eine sexuelle Periodizität insofern, als während der Polarnacht die Libido fehlt und die Menstruation aufhört und beide erst mit dem beginnenden Frühjahr wieder einsetzen.

Zur Erklärung des Lichteinflusses auf die Sexualsphäre haben eine Reihe von Forschern angenommen, daß die Lichtreize den Hypophysenvorderlappen zu einer vermehrten Ausschüttung von gonadotropen Hormonen anregen, welche die Gonaden stimulieren^{6, 8, 13, 31, 33, 61}. Das Empfangsorgan für die Lichtenergie soll dabei die Retina sein, welche die empfangenen Reize auf nervösem Wege zur Hypophyse leitet. Die zitierten Autoren führen für ihre Deutung vor allem an, daß bei den Versuchstieren nach Abdeckung der Augen⁶, Blendung¹¹ oder Zerstörung der Ganglienzellschicht der Retina⁶¹ die Lichtwirkung ausbleibt. Jedoch sind diese Feststellungen nicht ohne Widerspruch geblieben. Es finden sich Angaben, daß auch nach solchen Eingriffen der Lichteffekt noch zustandekommt^{9, 39} und offenbar dabei seinen Weg über die Haut nimmt³⁸.

Bei den Überlegungen, die sich aus den zuletzt angeführten Befunden ergeben, drängt sich die Vorstellung auf, daß die Lichtwirkung darin bestehen könnte, in der Haut vorhandenes Sexualhormon in eine wirksamere Form zu überführen. Denn diese Vorstellung über den Wirkungsmechanismus gibt Anknüpfungspunkte an bekannte Lichtwirkungen. Hier ist vor allem die Entdeckung anzuführen, daß in der Haut unter Lichteinwirkung aus den Provitaminen das Vitamin D gebildet werden

kann. Auch vermag das Ultraviolettlicht die indifferente Aminosäure Histidin in das hochwirksame Gewebshormon Histamin zu überführen²¹. Diese bedeutsamen Befunde legen die Annahme nahe, daß auch den Lichtwirkungen auf die Sexualsphäre ein photochemischer Wirkungsmechanismus, nämlich Aktivierung des Geschlechtshormons, zugrunde liegt.

Beim Follikelhormon, auf das sich die vorliegende Untersuchung beschränkt, könnte die Aktivierung in der Umwandlung von Oestron zu dem 8—10mal wirksameren Oestradiol-17 β * bestehen. Die Voraussetzungen für diese Vorstellung sind jedenfalls erfüllt. Einmal ist das Follikelhormon von verschiedenen Untersuchern in der Haut nachgewiesen^{2, 46, 55}. Zum andern wird die diskutierte Umwandlung tatsächlich durch extraovarielle Gewebe zustande gebracht^{24, 50, 66}. Es handelt sich dabei um die Reduktion der Ketogruppe des Oestrons zur Hydroxylgruppe des Oestradiol-17 β . Die Annahme, daß die Haut daran entscheidend beteiligt sein könnte, stützt sich weiter auf die Feststellung von P. WELS und seinen Mitarbeitern⁶⁴, daß die Haut besonders unter Einwirkung von Licht ein beträchtliches Reduktionsvermögen entwickelt. Diese Eigenschaft ist an die fixen Sulfhydrylkörper der Haut gebunden. Daß nun Sulfhydrylkörper an der Oestronreduktion im Organismus beteiligt sein könnten, ist zwar schon vor längerer Zeit von PINCUS⁵⁰ vermutet, jedoch nach unserer Kenntnis bisher nicht untersucht worden. Auf Vorschlag von P. WELS prüften wir daher in verschiedenen Versuchsanordnungen die Frage, ob Sulfhydrylkörper wirklich unter dem katalysierenden Lichteinfluß zur Reduktion des Oestrons zu Oestradiol-17 β („Aktivierung“ des Follikelhormons) fähig sind. Zugleich aber faßten wir zur Erklärung der jahreszeitlichen Oestrusperiodizität auch andere Gesichtspunkte ins Auge. Wir suchten uns ein Urteil zu verschaffen über den Anteil der Außentemperatur und des Nahrungsangebots an dem Zustandekommen dieser Erscheinung.

Methoden und Materialien.

Als Methode zur Bestimmung der Oestrogene wurde in allen Untersuchungsetappen der ALLEN-DOISK-Test verwandt. Bei diesem Verfahren werden Oestron und Oestradiol-17 β durch die ausgeprägte Differenz in ihrer oestrogenen Wirksamkeit voneinander unterschieden. — Unsere Untersuchungen wurden an kastrierten Rattenweibchen (*Mus norvegicus albinus*) vorgenommen. Das benutzte Tiermaterial stammte nicht aus einem reinen Inzuchtstamm; die zu erwartende stärkere Variation in der Empfindlichkeit glichen wir durch eine entsprechend größere Zahl von Versuchstieren aus. Die Versuchsgruppe bestand in der Regel aus 50 Tieren, es befanden sich dauernd 4 Gruppen (200 Ratten) im Versuch. Auf die homogene Zusammensetzung der Tiergruppen und die Konstanz der äußeren Bedingungen wurde besonders geachtet. Die Hormonlösungen wurden so unter die Bauchhaut

* Nach der Nomenklatur von L. F. u. M. FIESER²². Bis vor kurzem ist die Verbindung allgemein als α -Oestradiol bezeichnet worden.

gespritzt, daß immer eine sichtbare Quaddel entstand; nach unseren Erfahrungen kann die Streuung der Testwerte durch solche gleichbleibende Injektionstechnik bedeutend herabgesetzt werden. Die pro Injektion zu verabfolgende Dosis war in der Regel in 0,75 cm³ enthalten. Alle Spritzen waren durch Auswägen mit Wasser nachgeeicht. Die Gesamtdosis einer Austestung wurde auf 2 Injektionen im Abstand von 24 Std verteilt⁴⁰. Nach ausreichender Erfahrung haben wir uns auf 3 Abstriche (36, 48 und 54 Std nach der letzten Injektion) beschränken können. Als Merkmal für die positive Bewertung eines Abstriches wurde nur der Voll-oestrus mit reinem Schollenstadium anerkannt. Jedes Präparat wurde von drei, voneinander unabhängigen Personen beurteilt; die Ergebnisse zeigten in jedem Fall gute Übereinstimmung. Die Durchsicht wurde so angelegt, daß die betreffende Person nicht wußte, welches Präparat sie beurteilte. Die Testierungen wurden in wöchentlichem Turnus ausgeführt, nachdem wir uns vergewissert hatten, daß in diesem Intervall die Oestrusreaktion der vorangegangenen Testierung bei der eingehaltenen Dosierung regelmäßig abgeklungen ist. — Zur Feststellung der Fehlergrenze bei unserer speziellen Versuchsanordnung haben wir insgesamt 14 mal Oestron und Oestradiol-17 β an den 4 Tiergruppen vergleichsweise ausgetestet. Bei den verschiedenen Testierungen wurde die applizierte Dosis so variiert, daß die Oestrusreaktionen der Tiergruppen zwischen 10% und 90% lagen und somit alle in Frage kommenden Ausschläge erfaßt wurden. Die Versuche zur Bestimmung der Fehlergrenze wurden außerdem über die ganze Dauer unserer Untersuchung (3½ Jahre) verteilt, da das benutzte Tiermaterial in diesem Zeitraum mehrfach ausgewechselt werden mußte. Die mittlere Abweichung (σ) dieser Austestungen wurde mit 3,2 errechnet²⁷. Unter Voraussetzung einer Normalverteilung liegen dann zwischen $\bar{x} \pm 8,2$ (2,576 σ — 8,2) 99% aller Ergebnisse. Die gefundene Fehlergrenze wird im folgenden als Grundlage für die Beurteilung unserer Versuchsergebnisse benutzt. Nach allem ist eine „Aktivierung“ oder gegebenenfalls auch eine „Inaktivierung“ von Oestron auf irgendeine Behandlung hin dann sichergestellt, wenn der Prozentsatz oestrischer Tiere in der Versuchsgruppe um mehr als 16,4 von dem Prozentsatz der immer gleichzeitig angesetzten Kontrollgruppe abweicht. Da bekanntlich die Empfindlichkeit des Tiermaterials insgesamt nicht zu kontrollierenden Schwankungen unterliegt, können nur die Testwerte eines Versuches untereinander verglichen werden. Die benutzten Reinsubstanzen Oestron und Oestradiol-17 β wurden uns von der Schering-A.G.* zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der alkoholischen und wäßrigen Standardlösungen nahmen wir in enger Anlehnung an die von BEHRENS, HEUBNER, KOLL und KÜLZ⁵ gemachten Angaben vor. — Die untersuchten Sulfhydrylkörper stammten von folgenden Firmen: Cystein-HCl von Riedel-de Haen und Merck, Na-Thioglykolat und 4-Mercapto-benzoesäure-isoheptylester von Bayer, Dimercaptopropanol von Hydrierwerke Rodleben.

Die Belichtung der Oestronlösungen wurde in einer von P. WELS⁶⁵ beschriebenen Apparatur vorgenommen, welche eine gleichmäßige Bestrahlung der Ansätze gewährleistet. Als Strahlungsquelle diente dabei eine mit Gleichstrom betriebene Quecksilberdampf Lampe mit Hochdruckentladung (etwa 1 Atü) und Kippzündung. Nach Angaben der Herstellerfirma (A. W. Steinmann, Allersdorf-Königssee/Thüringen) reichen die emittierten Linien bis ins kurzwellige UV (239 m μ), doch liegt die ausgesandte Lichtenergie hauptsächlich im langwelligen UV (bei 313 und 365 m μ) und im sichtbaren Licht. Das in einem Teil der Versuche benutzte Filterglas BG 19⁵⁴ läßt nur das langwellige UV ab etwa 275 m μ und sichtbares Licht durch. Die Lösungen befanden sich in geschlossenen Quarzröhren mit einem Durchmesser von 2,5 cm.

* Auch an dieser Stelle möchten wir Herrn Prof. JUNKMANN danken.

Bei der Bestrahlung von Tiergruppen dienten als künstliche Strahlungsquelle zwei nebeneinander aufgehängte Quecksilberdampflampen mit Hochdruckentladung (etwa 1 Atü) und Kippzündung für Wechselstrombetrieb. Die spektrale Verteilung der ausgesandten Lichtenergie stimmt nach Angaben der Herstellerfirma (wie oben) mit der für Gleichstrombrenner genannten überein. Der Brennerabstand zu den bestrahlten Tieren betrug 1,50 m. — Die Sonnenbelichtungen fanden in den Monaten Juli bis September bei meist wolkenlosem Himmel in den Vormittagsstunden statt.

Jedes Versuchsergebnis wurde mindestens einmal, zumeist jedoch mehrfach reproduziert. Wichtige Ergebnisse wurden im Kreuzversuch gesichert.

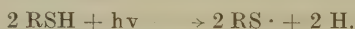
Versuchsergebnisse.

1. *Modellversuche mit Sulphydrylkörpern.* Um zu einem ersten Urteil über eine etwaige Aktivierung des Follikelhormons nach der Gleichung



zu gelangen, haben wir entsprechende Versuche im Reagensglase angestellt. Untersucht wurden Cystein und Natriumthioglykolat in wäßriger Lösung, Dimercaptopropanol (BAL) in alkoholischer Lösung und 4-Mercaptobenzoessäure-isoheptylester in ölgiger Lösung.

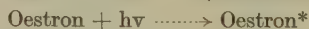
Voraussetzung für die vermutete Lichtkatalyse der obigen Reaktion ist, daß mindestens einer der beiden Reaktionspartner genügend Lichtenergie absorbiert. Die bisher untersuchten Mercaptane (Schwefelwasserstoff, Äthylmercaptan, Cystein) haben sämtlich eine merkliche Absorption erst unter $270 \text{ m}\mu^{1, 28, 43, 58}$, wobei von hier ab anscheinend eine für die SH-Gruppe charakteristische Absorption vorliegt. Wir haben daher die fragliche Reaktion zunächst in diesem Teil des Spektrums untersucht. Die photochemischen Reaktionen der SH-Verbindungen sind von BERSIN¹⁰ und von WEISS und FISHGOLD⁶³ geklärt worden. Danach findet u. a. eine Bildung von nascerendem Wasserstoff statt:



Bei Anwesenheit von Oestron könnte die Reaktion weiterverlaufen nach



Es war aber auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß das Oestronmolekül, dessen Ketogruppe noch bei $313 \text{ m}\mu$ absorbiert¹⁶, angeregt wird:



Auf diesem Wege könnte auch langwelligeres UV wirksam werden. Wir haben daher auch Versuche allein mit langwelligem UV durchgeführt.

Doch bevor wir Versuche über eine etwaige Strahlenkatalyse anstellten, mußten wir uns zunächst darüber Klarheit verschaffen, ob die Reaktion etwa schon spontan verlaufen kann. Bei diesen Versuchen wirkten auf 30—50 γ Oestron pro Ansatz folgende Thiolkonzentrationen ein: Cystein 6×10^{-3} bis $1,4 \times 10^{-2} \text{ m}$ (pH 7—8, Einwirkungszeit 1—14 Std), Na-Thioglykolat 6×10^{-2} bis $12 \times 10^{-1} \text{ m}$ (pH 7, Einwirkungszeit 1 Std), Dimercaptopropanol 3×10^{-2} bis $6 \times 10^{-1} \text{ m}$ (Einwirkungszeit 1 Std) und 4-Mercaptobenzoessäure-isoheptylester $1,7 \times 10^{-1}$

(Einwirkungszeit 20 Std). Trotz eines vieltausendfachen molaren Überschusses der Sulfhydrylkörper über Oestron, wurde in jedem Fall immer nur das eingewogene Oestron im ALLEN-DOISY-Test wiedergefunden (vgl. Versuchsbeispiele 1 u. 2 der Tab. 1). — Eine spontan ablaufende Reduktion von Oestron zu dem stärker oestrogen wirksamen Oestradiol-17 β oder zu den weniger aktiven Verbindungen Oestradiol-17 α und den Oestrandiolen ist damit für die untersuchten SH-Verbindungen ausgeschlossen.

Die Versuche mit zusätzlicher Belichtung der Oestron-Thiol-Ansätze bargen von vornherein die Schwierigkeit in sich, daß die ultravioletten Strahlen zwar — wie die früheren Modellversuche unseres Instituts gezeigt haben — bei der Beschleunigung der durch Thiole bewerkstelligten Reduktionen besonders wirksam sind, aber gleichzeitig auch die Zerstörung der Hormonaktivität verursachen konnten. Wir haben daher Versuche zur Feststellung derjenigen Expositionszeiten anstellen müssen, bei denen mit einer wesentlichen Oestroninaktivierung nicht gerechnet zu werden brauchte. Wir fanden, daß unter unseren Versuchsbedingungen das volle UV-Licht nach 3 min die Aktivität einer wäßrigen Hormonlösung eben herabsetzt, während langwelliges UV (vgl. Methodik) noch nach 30minütiger Einwirkung zu keinem eindeutigen Aktivitätsverlust führt.

Bemerkenswert ist, daß mit reinem Stickstoff, Wasserstoff oder Sauerstoff gesättigte Lösungen das gleiche Ausmaß der Strahleninaktivierung des Oestrons zeigten. Diese Feststellung schließt weitgehend die Möglichkeit aus, daß die Inaktivierung durch Strahlenoxydation zustandekommt, wie das ALLEN u. ELLIS³ vermutet haben. Wir dürfen vielmehr annehmen, daß auch unter unseren abweichenden Versuchsbedingungen das von BUTENANDT u. Mitarb.¹⁷ beschriebene Lumi-Oestron gebildet wurde, das im ALLEN-DOISY-Test noch beim 100fachen der Wirkungsdosis des Oestrons völlig unwirksam ist.

Die beschriebenen Sulfhydryl-Oestron-Ansätze wurden nun — unter Berücksichtigung der ermittelten, geeigneten Expositionszeiten — der Bestrahlung mit dem vollen und gefilterten Licht der Hg-Dampflampe ausgesetzt. Wir fanden in keinem Fall eine Aktivitätssteigerung, welche auf eine Bildung von Oestradiol-17 β hätte schließen lassen können (vgl. Versuchsbeispiele 2 und 3).

2. *Bestrahlungsversuche an Ratten.* Die Ergebnisse der beschriebenen Reagensglasversuche haben die der Untersuchung zugrundeliegende Hypothese, daß das Oestron unter der Wirkung des Lichtes durch die Sulfhydrylgruppe reduziert werden könnte, schon stark erschüttert. Es blieb jedoch noch zu klären, ob nicht etwa doch die besonderen, im Eiweißmolekül verankerten, SH-Gruppen der Haut zur Oestronreduktion unter Lichteinfluß fähig sind. Wir haben zur Entscheidung dieser Frage zunächst als Versuchsobjekt die isolierte, unter Überlebensbedingungen gehaltene, Ohrmuschel des Kaninchens gewählt, die sich bei früheren

Untersuchungen zur Darstellung der Reduktionswirkungen der Haut bewährt hatte (^{48, 52}; dort auch Angaben zur Methodik). Dieses Versuchsobjekt mußte jedoch verlassen werden, da nach der Durchströmung der Ohrmuscheln mit Oestronlösungen die zugesetzten Hormonmengen nicht quantitativ zu extrahieren waren. Daraufhin gingen wir dazu über, die für den ALLEN-DOISY-Test benutzten Ratten selbst zur Entscheidung der Frage heranzuziehen. In diesen Versuchen spritzten wir den 4 Tiergruppen eine gleiche, wenig wirksame Oestron dosis ein und bestrahlten

Tabelle 1.

Versuchs- beispiel	Ansatz	Eingewogene Oestrogendosis pro Tier γ	Prozentsatz oestrischer Tiere %
1	50 γ Oestron (Kontrolle)	0,75	12
	50 γ Oestron, 6×10^{-3} m Cystein (pH 7). Einwirkungszeit 1 Std	0,75	17
	50 γ Oestron, 6×10^{-1} m BAL. Einwir- kungszeit 1 Std	0,75	14
	50 γ Oestron, 12×10^{-1} Na-Thioglykolat (pH 7). Einwirkungszeit 1 Std	0,75	10
2	45 γ Oestron (Kontrolle)	0,675	14
	45 γ Oestron, $1,7 \times 10^{-1}$ m 4-Mercapto- benzoesäure-isoheptylester. Einwirkungs- zeit 20 Std	0,675	6
	45 γ Oestron, $1,7 \times 10^{-1}$ m 4-Mercapto- benzoesäure-isoheptylester. 3 min volles UV	0,675	4
3	30 γ Oestron (Kontrolle)	0,45	2
	30 γ Oestron, 12×10^{-1} m Na-Thio- glykolat. 30 min gefiltertes UV	0,45	2
	30 γ Oestradiol-17 β (Kontrolle)	0,45	88
4	unbestrahlte Tiergruppe nach Oestron- injektion	0,75	18
	nach Oestroninjektion 2×2 Std mit Quecksilberdampflampe bestrahlte Tier- gruppe	0,75	6
	nach Oestroninjektion 2×2 Std dem Sonnenlicht ausgesetzte Tiergruppe	0,75	9

3 dieser Gruppen in verschiedener Anordnung mit natürlichem oder künstlichem Licht (siehe Methodik). Alle Bestrahlungen wurden an den beiden Injektionstagen durchgeführt und in der Regel dann begonnen, wenn sämtliche Tiere einer Gruppe ihre Dosis Oestron erhalten hatten. Die Belichtungen mit der Quecksilberdampflampe wurden teilweise noch

6 Std nach der Injektion wiederholt oder auch unmittelbar vor der Injektion durchgeführt. Die Expositionszeiten wurden zwischen 2×10 bis 2×150 min variiert.

Die Versuche ergaben mit aller Klarheit, daß die Oestrusreaktion kastrierter Ratten auf Injektion von Oestron weder durch das Licht der Quecksilberdampflampe noch durch Sonnenlicht gesteigert wird (vgl. Versuchsbeispiel 4). Die einleitend begründete Vorstellung, daß das Licht seine bei verschiedenen Tiergattungen festgestellten, fördernden Wirkungen auf die Sexualsphäre über eine reduktive Aktivierung des Oestrons ausübt, wäre jedoch erst endgültig widerlegt, wenn sich nachweisen ließe, daß unser Versuchsobjekt, die Ratte, überhaupt zu den Tieren gehört, bei denen das Licht einen Einfluß auf die Sexualperiodizität hat. Denn nur dann wäre erwiesen, daß die in Rede stehenden Lichtwirkungen auf einem anderen Wege als über die angenommene Aktivierung des Follikelhormons zustandekommen müssen. Die vorliegenden Literaturdaten lassen kein eindeutiges Urteil darüber zu, ob das Licht auch bei der Ratte die Sexualfunktion mitreguliert.

Hess und Smith³² fanden, daß Ratten nach 6monatiger Quarzlampebestrahlung keine Beeinflussung der endokrinen Drüsen zeigen. Browman¹⁵ beobachtete, daß ständige Belichtung mit gewöhnlichen Glühlampen bei Ratten eine Verlängerung der vaginalen Verhornungserscheinungen, welche den Oestrus kennzeichnen, zur Folge hat; doch zeigten 3 Rattengenerationen, die bei dauernder Belichtung aufwuchsen, keine wesentlichen Unterschiede gegenüber nahe verwandten Würfen, die unter normalen Bedingungen aufgezogen wurden. Fiske²⁵ berichtete, daß unter zusätzlicher Belichtung infantile Rattenweibchen etwas früher (6 Tage) zur sexuellen Reife kommen als unter gewöhnlichen Laboratoriumsbedingungen. B. J. und R. K. Meyer⁴⁵ schreiben dem Licht jedoch nur wenig Wirkung auf die sexuelle Entwicklung von infantilen Ratten zu.

Wir suchten diese, für unser Untersuchungsziel wichtige Frage zu klären und prüften, ob sich die Entwicklung der sexuellen Reife bei infantilen weiblichen Albinoratten durch Belichtung beschleunigen läßt.

Zu diesem Zweck wurden 150 weibliche Albinoratten aus der gleichen Zucht im Gewicht von 50—70 g beschafft. Von den Tieren wurden zunächst 14 Tage lang Scheidenabstriche angefertigt und 86 Tiere, welche schon oestrische Scheidenveränderungen zeigten, ausgesondert. Die restlichen infantilen Ratten wurden in 2 Versuchsgruppen von je 32 Tieren geteilt, wobei darauf geachtet wurde, daß die gewichtsmäßige Zusammensetzung der beiden Gruppen etwa gleich war. Alle in diesem Versuch stehenden Ratten wurden unter denselben Bedingungen im gleichen Raum gehalten, zu dem nur wenig Tageslicht eintrat. Eine der beiden Gruppen wurde täglich je 1 Std vormittags und nachmittags dem Licht einer Quecksilberdampflampe ausgesetzt (siehe Methodik). Der Versuch wurde in den Monaten Oktober bis Dezember durchgeführt, da in dieser Jahreszeit die cyclische Brunst seltener spontan eintritt und wir daher annehmen durften, daß ein etwaiger beschleunigender Effekt des Lichts sich besonders deutlich zeigen würde. Das Eintreten der cyclischen Brunst wurde mit Hilfe täglicher Scheidenabstriche kontrolliert. Es wurden diejenigen Tiere als sexuell reif gezählt, welche im Vaginalabstrich die regelmäßigen Cyclen erkennen ließen.

Der Versuch ist in der nachstehenden Abb. 1 ausgewertet. Diese zeigt, daß die Zahl der brünstigen Tiere in den ersten Wochen in der bestrahlten Gruppe regelmäßig größer war als in der unbestrahlten Kontrollgruppe, während sich später die Unterschiede zunehmend verwischten. — Bestrahlung mit der Quecksilberdampflampe scheint also das Eintreten der sexuellen Reife bei infantilen weiblichen Albinoratten zu beschleunigen. Da nach unseren vorangegangenen Versuchen mit eingespritztem Oestron eine „Aktivierung“ des Follikelhormons in der Haut als ausgeschlossen gelten darf, muß der beobachteten Beschleunigungswirkung des Lichts ein anderes Wirkungsprinzip zugrunde liegen. Jeder Erklärungsversuch

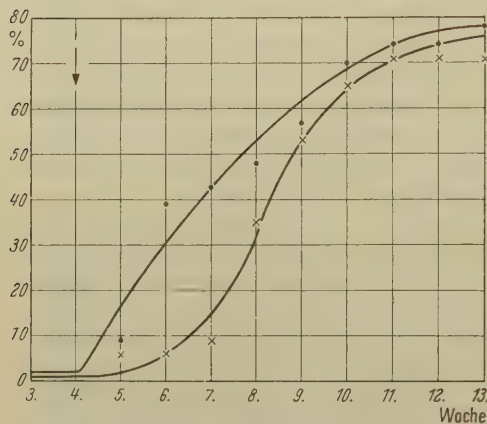


Abb. 1. Entwicklung der sexuellen Reife bei zwei Gruppen infantiler Rattenweibchen (beurteilt nach dem Prozentsatz von Tieren mit regelmäßigen Cyclen im Scheidenabstrich): —•—• bei UV-Bestrahlung (Beginn ↓); × — × ohne Bestrahlung.

können, wobei vor allem jahreszeitliche Schwankungen der Außentemperatur und des Nahrungsangebots in Erwägung gezogen worden sind.

So haben SZEGO und ROBERTS⁶⁰ festgestellt, daß starke Kältereize einen hemmenden Einfluß auf die oestrogene Stimulierung des Uterus ausüben. Dagegen hat nach BENOTT⁶ die Wärme keinen Einfluß auf die genitale Aktivität des Erpels in der sexuellen Ruhezeit. Nach WAGENER⁶² ist die Legeleistung von Hühnern im Bereich normaler Stalltemperaturen temperaturunabhängig. PARKES und BRAMBELL⁴⁹ kommen zu dem Schluß, daß die winterliche brunstfreie Zeit der wildlebenden Tiere weniger der Kälte als dem Nahrungsmangel zuzuschreiben ist. WILSON und DE FLOYDE⁶⁷ und MULINOS u. Mitarb.⁴⁷ haben gezeigt, daß bei Rattenweibchen der Cyclus durch verminderte Nahrungsaufnahme vollständig gestoppt werden kann. Die erhöhte Legetätigkeit von Hühnern bei künstlicher Belichtung kommt nach LERUER⁴² auch ohne zusätzliche Futtersaufnahme zustande.

Um ein Urteil über die Bedeutung dieser Faktoren für die Brunstreaktion zu gewinnen, haben wir eine Reihe von Versuchen angestellt. Wir mußten bei der Versuchsplanung berücksichtigen, daß bei langfristigen Untersuchungen leicht Sekundärfaktoren das Ergebnis verfälschen

muß nach allem davon ausgehen, daß für das Zustandekommen des Lichteffektes die Anwesenheit der Ovarien notwendig ist. Offenbar stimuliert das Licht auf bestimmten, noch zu diskutierenden Wegen (siehe Diskussion) die Ovarialfunktion.

3. Bedeutung von Außentemperatur und Nahrungsangebot. Es ist verschiedentlich diskutiert worden, ob die jahreszeitlich gebundene Brunst bei den verschiedenen Tierarten nicht auch durch andere Faktoren als durch die Lichtverhältnisse reguliert werden

können. So werden z. B. bei längerer Unterernährung Vitaminmangelzustände für den Versuchsausfall von Bedeutung⁵⁶. Auch werden bei langfristiger Kälteexposition die Laboratoriumstiere leicht von Infektionskrankheiten befallen, wodurch die Resultate beeinflußt werden. Aus diesen Gründen haben wir den kurzfristigen Versuch bevorzugt. Wir prüften im ALLEN-DOISY-Test die Reaktionsfähigkeit der kastrierten Ratte auf eingespritztes Follikelhormon bei verschiedenen Außentemperaturen und im Hungerzustand.

Dazu wurden Gruppen von (durchschnittlich 25) Tieren jeweils kurz vor der ersten Injektion des Oestrogens in einen kühlen Raum gebracht, wo sie bis Versuchsende (letzter Scheidenabstrich) verblieben. Diese Tiere erhielten entweder das normale Futter oder es wurde ihnen in einem Teil der Versuche vollständig entzogen, so daß sie während der 3 $\frac{1}{2}$ Versuchstage nur Wasser zu sich nehmen konnten. Die Vergleichsgruppen befanden sich bei normaler Temperatur und normalem Futterangebot. Die Durchschnittstemperatur wurde bei den verschiedenen Versuchen im kühlen Raum zwischen + 7° C und + 14° C variiert, die zugehörigen Temperaturen im warmen Raum lagen regelmäßig 14—16° höher. Die Lichtverhältnisse waren immer vergleichbar.

Die Versuche über die Temperaturabhängigkeit der Oestrusreaktion im ALLEN-DOISY-Test wurden sowohl mit Oestron wie mit Oestradiol-17 β angestellt; es ergaben sich in den angegebenen Temperaturbereichen keine eindeutigen Abweichungen. Auch die Tiere, welche bei niedriger Außentemperatur und gleichzeitig im Hungerzustand getestet wurden, zeigten sowohl nach Einspritzung von Oestron wie von Oestradiol-17 β keine veränderte Ansprechbarkeit gegenüber den Kontrollgruppen. Die Untersuchung wurde in allen Dosisbereichen vorgenommen, so daß uns Ausschläge nach der einen oder anderen Richtung nicht entgangen sein können. Unter unseren Versuchsbedingungen war also ein eindeutiger Einfluß der Außentemperatur und des Nahrungsangebots auf die Brunstreaktion im ALLEN-DOISY-Test nicht festzustellen. Wir neigen daher der Schlußfolgerung zu, daß diese Faktoren erst in ihren Extremen von Bedeutung werden und wohl bei der Regulierung der jahreszeitlich gebundenen Brunst nur eine untergeordnete Rolle spielen. Wir stimmen darin mit HAFEZ³⁰ überein, welcher ebenfalls dem Licht die beherrschende Rolle zuspricht.

Diskussion.

Ausgangspunkt unserer Versuche zum Lichteinfluß auf die jahreszeitliche Oestrusperiodizität war die gut begründete Vorstellung, daß die Lichtwirkung auf eine Aktivierung des Follikelhormons (Reduktion von Oestron zu dem mehrfach aktiveren Oestradiol-17 β) zurückgeht. Die aufgeworfene Frage konnte nach eingehender Prüfung eindeutig negativ beantwortet werden. Es wurde sichergestellt, daß der Lichteffect auf einem anderen Wege zustandekommen muß. Die folgenden Erörterungen,

welche sich auf dieses Ergebnis unserer Untersuchung stützen, sollen einen Überblick über die noch offenstehenden Erklärungsmöglichkeiten geben.

Das hauptsächliche Empfangsorgan der Lichtenergie ist die Haut, und es liegt daher immer die Annahme nahe, daß durch Licht hervorgerufene Wirkungen auch von photochemischen Prozessen in der Haut ihren Ausgang nehmen. Die nachgewiesene Anreicherung des Follikelhormons in der Haut läßt die Vorstellung zu, daß das Hormon hier photochemischen Umsetzungen unterliegt, welche für den Organismus von Bedeutung sind. Jedoch kann nach unseren Versuchen *in vitro* und an der kastrierten Ratte das Bestrahlungsprodukt keine gesteigerte oestrogene Wirksamkeit besitzen. Nun soll aber nach FIGGE²³ Oestron *in vitro* durch UV-Bestrahlung in ein Produkt umgewandelt werden können, das bei nur noch geringer oestrogener Wirksamkeit eine anregende Wirkung auf die Sekretion der gonadotropen Hormone im Hypophysenvorderlappen ausübt. Falls nachgewiesen werden könnte, daß unter Einwirkung ultravioletter Strahlen auch in der Haut ein hypophysenstimulierendes Photoderivat des Oestrone entsteht, ergäbe sich eine einfache Erklärung für die beobachtete beschleunigende Wirkung des UV auf die sexuelle Entwicklung von infantilen Rattenweibchen. Aber auch wenn sich die Beobachtung FIGGES in diesem Sinne erweitern ließe, käme ihr im Rahmen des Gesamtproblems keine allgemeinere Bedeutung zu. Denn die Lichtwirkungen auf die jahreszeitliche Sexualperiodizität werden auch durch sichtbares Licht ausgelöst, das zu der postulierten photochemischen Umsetzung nicht imstande ist.

Als Vermittlerorgan für Lichtreize kommt weiter der von EHRENEWALD²⁰ beschriebene „Strahlensinn“ in Frage, welcher in der Umgebung der Augen lokalisiert sein soll und möglicherweise an die vereinzelt photosensiblen Zellen in der Epidermis³⁴ gebunden ist. Daraus könnte sich eine Erklärung für die einleitend zitierten Beobachtungen ergeben, daß auch nach Ausschaltung der optischen Bahnen der Lichteffect auf die Sexualsphäre zustandekommen kann. Die Lichtreize würden dann, wie die von der Retina aufgenommenen, letzten Endes die Hypophyse zu einer vermehrten Sekretion von gonadotropen Hormonen stimulieren. Der Weg über das Auge scheint jedoch nach den Untersuchungen von HOLLWICH³⁶ und von FUCHS²⁶ an Blinden der bedeutungsvollere zu sein. Dieser „energetische Anteil der Sehbahn“, welcher über den Hypothalamus die Hypophyse erreicht, reguliert nach neueren Untersuchungen nicht nur die Bildung und Ausschüttung der gonadotropen Hormone und des Melanophorenhormons⁴¹, sondern auch des thyreotropen Hormons⁵¹ und des Adiuretins^{14, 35}. Es scheint hier ein fruchtbares Feld für weitere Untersuchungen über physiologische Lichtwirkungen vorzuliegen.

Zusammenfassung.

Es werden Untersuchungen über die Frage mitgeteilt, ob der bekannte Lichteffect auf die jahreszeitliche Oestrusperiodizität über eine vom Licht ausgelöste oder beschleunigte „Aktivierung“ des Follikelhormons (Reduktion von Oestron zu dem vielfach wirksameren Oestradiol 17 β) in der Haut zustandekommt. Die Resultate erlauben den Schluß, daß dies nicht zutrifft. Sie unterstützen vielmehr die Vorstellung, daß der Lichteinfluß auf die Sexualaktivität nervös auf dem Wege Netzhaut — Hypothalamus — Hypophyse vermittelt wird, über welchem Bildung und Ausschüttung der gonadotropen Hormone beeinflußt werden.

Literatur.

- ¹ ABDERHALDEN, E., u. E. ROSZNER: Z. physiol. Chem. **178**, 156 (1928). —
- ² ALBERT, S., R. D. H. HEARD, C. P. LEBLOND and J. SAFFRAN: J. of Biol. Chem. **177**, 247 (1949). — ³ ALLEN, E., and M. M. ELLIS: J. Amer. Med. Assoc. **85**, 94 (1925). — ⁴ BAKER, J. R.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **110**, 313 (1932). — ⁵ BEHRENS, B., W. HEUBNER, W. KOLL u. F. KÜLZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **186**, 121 (1937). — ⁶ BENOIT, J.: C. r. Soc. Biol. Paris **117**, 664, 669 (1935). — Bull. Soc. sexol. Paris **3**, 438 (1936). — ⁷ BENOIT, J., et L. OTT: C. r. Soc. Biol. Paris **127**, 906 (1938). — ⁸ BENOIT, J., P. MANDEL, F. X. WALTER u. I. ASSENMACHER: C. r. Soc. Biol. Paris **144**, 1400, 1403 (1950). — ⁹ BENOIT, J.: C. r. Soc. Biol. Paris **120**, 133 (1935); **127**, 909 (1938). — ¹⁰ BERSIN, TH.: Z. physiol. Chem. **222**, 177 (1933). — ¹¹ BISSONNETTE, T. H.: Amer. J. Anat. **45**, 289 (1930). — J. exper. Zool. **58**, 291 (1931). — Physiol. Zool. **4**, 452 (1931). — Science (Lancaster, Pa.) **75**, 18 (1932). — Quart. Rev. Biol. **8**, 201 (1933). — ¹² BISSONNETTE, T. H.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **110**, 322 (1932). — J. of exper. Biol. **12**, 315 (1935). — ¹³ BISSONNETTE, T. H.: J. of exper. Zool. **71**, 341 (1935). — ¹⁴ BOYD, E. M., B. K. LEE u. M. E. T. STEVENS: Endocrinology **32**, 27 (1943). — ¹⁵ BROWMAN, L. G.: J. exper. Zool. **75**, 375 (1937). — ¹⁶ BUTENANDT, A., W. FRIEDRICH u. L. POSCHMANN: Ber. **75**, 1931 (1942). — ¹⁷ BUTENANDT, A., A. WOLF u. P. KARLSON: Ber. **74**, 1308 (1941). — ¹⁸ CLARK, L. B., S. L. LEONARD and G. BUMP: Science (Lancaster, Pa.) **85**, 339 (1937). — ¹⁹ COOK, zit. nach LL. J. LLEWELLYN: Nature (Lond.) **129**, 868 (1932). — ²⁰ EHRENWALD, H.: Klin. Wschr. **1933**, 1473. — ²¹ ELLINGER, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **136**, 129 (1928); **153**, 120 (1930). — ²² FIESER, L. F., and M.: Natural products related to phenanthrene. New York: Reinhold Publishing Corporation 1949. — ²³ FIGGE, F. H. J.: Endocrinology **36**, 178 (1945). — ²⁴ FISH, W. R., and R. I. DOREMAN: Science (Lancaster, Pa.) **91**, 388 (1940). — J. of Biol. Chem. **140**, 83 (1941); **143**, 15 (1942). — ²⁵ FISKE, V. M.: Endocrinology **29**, 187 (1941). — ²⁶ FUCHS, J.: Dtsch. med. Wschr. **1953**, 1054. — ²⁷ GADDUM, J. H.: Pharmacologie. Darmstadt: Steinkopff 1952. — ²⁸ GOODEVE, C. F., u. N. O. STEIN: Transact. Faraday Soc. **27**, 393 (1931). — ²⁹ GRESSON, R. A. R.: Proc. Roy. Soc. Edinburgh **60**, 333 (1940). — ³⁰ HAFEZ, E. S. E.: Experientia (Basel) **7**, 353 (1951). — ³¹ HART, D. S.: J. of exper. Biol. **28**, 1 (1951). — ³² HESS, A. F., and PH. E. SMITH: Amer. J. Dis. Childr. **41**, 775 (1931). — ³³ HILL, M., and A. A. PARKES: Proc. Roy. Soc. Lond. B **113**, 530, 537 (1933). — ³⁴ HOFFMANN, E.: zit. nach EHRENWALD. — ³⁵ HOFMANN-CREDNER, D.: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 241 (1952). — ³⁶ HOLLWICH, F.: Graefes Arch. **149**, 592 (1949); **150**, 529 (1950). — ³⁷ HOOVER, E. E.: Science (Lancaster, Pa.) **85**, 425 (1937). — ³⁸ IVANOVA, S.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **179**, 349 (1935). — ³⁹ JEFFERSON, J. M.: J. Anat. **75**, 106 (1940). — ⁴⁰ KOLL, W., u. H. NOCKEN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **191**, 340 (1939). — ⁴¹ KOLLER, G.,

u. W. RODEWALD: Pflügers Arch. **232**, 637 (1933). — ⁴² LERUER, J. M.: Poultry Science **26**, 202 (1947). — ⁴³ LEY, H., u. B. ARENDS: Z. physik. Chem. B **15**, 311 (1932). — ⁴⁴ MARSHALL, F. H. A.: J. of exper. Biol. **17**, 139 (1940). — ⁴⁵ MEYER, B. J., u. R. K.: Endocrinology **34**, 276 (1944). — ⁴⁶ MIESCHER, K.: Recent progress in hormone research **3**, 47 (1948). — ⁴⁷ MULINOS, M. G., L. POMERANTZ, J. SMELSER and R. KURZROCK: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **40**, 79 (1939). — ⁴⁸ ORTMANN, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **191**, 12 (1939); **192**, 96 (1939). — ⁴⁹ PARKES, A. S., and F. W. R. BRAMBELL: J. of Physiol. **64**, 388 (1928). — ⁵⁰ PINCUS, G.: Cold Spring Harbor Sympos. quant. Biol. **5**, 44 (1937). — ⁵¹ PUNTRIANO, G., u. U. J. MEITES: Endocrinology **48**, 217 (1951). — ⁵² ROESCH, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **218**, 394 (1953). — ⁵³ ROWAN, W.: Nature (Lond.) **115**, 494 (1925). — Proc. Boston Soc. Nat. Hist. **38**, 147 (1926). — Nature (Lond.) **122**, 11 (1928). — ⁵⁴ SCHOTT u. Gen.: Jenaer Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik. Liste 7358. — ⁵⁵ SCHREUS, H. TH., u. H. OBERSTE-LEHN: Dermat. Wschr. **123**, 245 (1951). — ⁵⁶ SEGALOFF, A., u. A.: Endocrinology **34**, 346 (1944). — ⁵⁷ SHEARD, CH., u. G. M. HIGGINS: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **27**, 467 (1929/30). — ⁵⁸ STENSTRÖM, W., and M. REINHARD: J. of Biol. Chem. **66**, 819 (1925). — ⁵⁹ SVETOSAROV, E., u. G. STREICH: C. r. Acad. Sci. U.R.S.S., N. s. **27**, 398 (1940), zit. nach Ber. ges. Physiol. **122**, 581 (1941). — ⁶⁰ SZEGO, C. M., and S. ROBERTS: Amer. J. Physiol. **152**, 131 (1948). — ⁶¹ THOMSON, A. P. D.: J. of Physiol. **113**, 425 (1951). — ⁶² WAGENER, K.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **1949**, 107. — ⁶³ WEISS, J., and H. FISHGOLD: Nature (Lond.) **137**, 71 (1936). — ⁶⁴ WELS, P.: Strahlenther. **86**, 8 (1951). — ⁶⁵ WELS, P.: Pflügers Arch. **223**, 395 (1930). — ⁶⁶ WESTERFELD, W. W., u. E. A. DOISY: Ann. Int. Med. **11**, 267 (1937). — ⁶⁷ WILSON, R. H., u. E. DE FLOYDE: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **59**, 260 (1937).

Doz. Dr. K. REPKE, Greifswald, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.

Über fermentative Reduktion von Oestron*.

Von

K. REPKE und F. MARKWARDT.

(Eingegangen am 8. Juni 1954).

Die Reduktionsprodukte des Oestrone, die bei der Hydrierung mit chemischen Mitteln erhalten werden, sind auch als Metaboliten bei Mensch oder Tier gefunden worden (Übersichten bei WERLE 1943, MARRIAN 1946, PEARLMAN 1948, FIESER 1949, JAILER 1949, FISHMAN 1951 und DOREMAN u. UNGAR 1953). Es handelt sich um die biologisch inaktiven Oestradiole, das wenig wirksame Oestradiol- $17\alpha^1$ und das hochaktive Oestradiol- $17\beta^1$. Vor allem die letztgenannte Verbindung, die im ALLEN-DOISY-Test etwa $8-10 \times$ wirksamer als Oestron ist, wurde bei Stoffwechselversuchen isoliert und ist wohl auch das hauptsächliche Reduktionsprodukt des Oestrone. Während Einigkeit darüber besteht, daß für die biologische Reduktion zu Oestradiol- 17β Uterus und Ovarien nicht wesentlich sind, herrscht noch keine Übereinstimmung in der Frage, welche Gewebe eigentlich daran beteiligt sind. (Die zu dieser Frage gemachten Angaben werden, soweit eine unmittelbare Beziehung zu unseren Versuchsobjekten gegeben ist, später zitiert.) Vor allem ist die Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Fermente bislang kaum in Angriff genommen. Die vorliegende Untersuchung bemüht sich um die Aufklärung der fermentativen Reduktion von Oestron zu Oestradiol- 17β .

Methoden und Materialien.

Als Bestimmungsmethode der Oestrogene diente der ALLEN-DOISY-Test; unser spezielles Vorgehen ist schon in der vorangehenden Mitteilung beschrieben (REPKE u. MARKWARDT 1954b). Oestron wird bei diesem Verfahren von seinen Reduktionsprodukten durch deren abweichende Wirkungswerte unterschieden. Eine signifikante Abweichung ist bei der von uns geübten Technik gegeben, wenn der Prozentsatz oestrischer Tiere in der Versuchsgruppe um mehr als 16 mit dem Prozentsatz der immer gleichzeitig angesetzten Kontrollgruppe differiert. Da die Empfindlichkeit des Tiermaterials insgesamt bekanntlich nicht kontrollierbaren Schwankungen

* Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Bonn am 7. Oktober 1953 vorgetragen (REPKE u. MARKWARDT [1954a]).

¹ Nach der Nomenklatur von L. F. u. M. FIESER (1949).

unterliegt, können nur die Testwerte *eines* Versuches untereinander verglichen werden. Die in den Tabellen aufgeführten Prozentzahlen oestrischer Tiere beziehen sich immer auf 50 kastrierte Ratten, die zur Auswertung eines jeden Ansatzes verwendet wurden. Während die Aktivitätszunahme einer inkubierten Oestronlösung eindeutig für die Bildung von Oestradiol-17 β spricht, läßt sich bei Aktivitätsabnahme nicht entscheiden, ob Oestradiol-17 α oder Oestradiole oder auch Abbauprodukte des Oestrone entstanden sind. — Der ALLEN-DOISY-Test hat vor den bekannten chemischen oder physikalischen Verfahren den Vorzug, daß er nur relativ begrenzte Reinigungsverfahren erfordert; allerdings ist die verlustlose Abtrennung der Oestrogene von den Proteinen Voraussetzung für die quantitative Bestimmung. Wir haben zunächst in üblicher Weise die Oestrogene durch Kochen mit Benzol oder Butanol am Rückflußkühler extrahiert. Als noch zweckmäßiger erwies sich, die Proteine mit dem 5fachen Volumen absoluten Alkohols auszufällen und anschließend abzufiltrieren. Das alkoholische Filtrat wurde danach auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 2 cm³ Äthanol aufgenommen und die wäßrige Testlösung kurz vor der Auswertung durch Verdünnung mit kochender physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Neben der Bestimmung der Aktivität im ALLEN-DOISY-Test haben wir Oestradiol-17 β als Produkt der fermentativen Umsetzung auch durch Schmelzpunktbestimmung und durch papierchromatographische Analyse zu identifizieren gesucht. Zur Schmelzpunktbestimmung mußte zunächst entsprechend der Vorschrift von PINCUS u. PEARLMAN (1941, 1942) aus dem Rückstand (vgl. oben) nach Behandlung mit Bernsteinsäureanhydrid Oestradiol als Monosuccinat isoliert werden. Daraus konnte nach dem Verseifen mit methyllalkoholischer Kalilauge reines Oestradiol gewonnen werden, dessen Schmelzpunkt nach Umkristallisieren aus Äthanol in der Mikroapparatur nach KOFLER bestimmt wurde. Das gleichfalls untersuchte Diacetat des Oestradiols erhielten wir nach der Vorschrift von BRUGSCH u. Mitarb. (1952). Zur Papierchromatographie benutzten wir nach ZAFFARONI u. Mitarb. (1950) mit Formamid getränktes Papier (Schleicher & Schüll 2043b) und entwickelten absteigend mit formamidgesättigtem Benzol bei Zimmertemperatur; angefärbt wurde mit Jod nach BUSH (1950). Das Diacetat wurde auf siliconbehandeltem Papier chromatographiert (MARKWARDT 1954).

Das Succinodehydrogenase-Präparat wurde in bekannter Weise aus dem Herzmuskel des Rindes dargestellt (OHLSSON 1921). — Das Hämolytat (rote Blutzellen vom Kaninchen) wurde nach der Vorschrift von WARBURG u. CHRISTIAN (1931) hergestellt. Glucose-6-phosphat haben wir zunächst auf dem Wege der enzymatischen Veresterung von Glucose durch Hefemacerationssaft (NEUBERG u. LEIBOWITZ 1927) gewonnen. Später sind wir dazu übergegangen, Fructose-6-phosphat als Substrat zu verwenden, weil es sich bequem aus Hexosediphosphat („Candiolin“, Bayer) darstellen läßt (NEUBERG 1918). Durch manometrische Kontrollversuche haben wir uns vergewissert, daß Fructose-6-phosphat durch Hämolytat in gleichem Umfang wie Glucose-6-phosphat veratmet wird. Die Hexose-6-phosphat-Lösungen wurden vor jedem Versuch aus den Bariumsalzen frisch bereitete. — Die Aktivität der Succinodehydrogenase und der wasserstoffübertragenden Fermente der Glykolyse in Hautschnitten (Epidermis des Meerschweinchens) wurde mit Hilfe der THUNBERG-Technik kontrolliert; allerdings benutzten wir dabei als Reduktionsindicator an Stelle des Methylenblaus wegen seiner vielfachen Vorzüge das Triphenyltetrazoliumchlorid¹ (vgl. BRODIE u. GOTS 1951). — Alle Fermentansätze waren durch Zusatz von Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt und wurden

¹ Triphenyltetrazoliumchlorid und Triphenylformazan verdanken wir Herrn Prof. R. KUHN, Heidelberg.

in reinem Stickstoff, im Vakuum oder in Luft bei einer Temperatur von 37,4° C bebrütet. Um das Wachstum von Bakterien auszuschalten, die bekanntlich zu Umsetzungen von Steroiden fähig sind, wurde jeder Ansatz mit je 2500 IE Penicillin und Streptomycin beschickt. Die Oestrogene wurden in konzentrierter alkoholischer Lösung zugesetzt, wobei niemals mehr als 0,1 cm³ Äthanol auf einen Ansatz kam. Die benutzten Reinsubstanzen Oestron, Oestronacetat, Oestronbenzoat und Oestradiol-17 β waren uns von der Schering-A.G.¹ zur Verfügung gestellt. Die alkoholischen und wäßrigen Standardlösungen wurden in enger Anlehnung an die von BEHRENS, HEUBNER, KOLL u. KÜLZ (1937) gemachten Angaben hergestellt.

Versuchsergebnisse.

1. *Succinodehydrogenase* (*Herzmuskel*). MIWA, ITO u. HAYAZU (1940) haben in einer kurzen Mitteilung angegeben, daß ihnen bei Verwendung der Succinodehydrogenase aus Rinderherzen erstmals die Hydrierung des Oestrons zu Oestradiol-17 β mit einem isolierten Ferment gelungen sei. BERSIN (1951) spricht dieser Dehydrogenase sogar die Fähigkeit zu, auch den umgekehrten Vorgang zustandebringen zu können. Im Gegensatz dazu haben nach Inkubation mit Succinodehydrogenase McSHAN u. Mitarb. (1947) Oestronsulfat und DE MEIO u. Mitarb. (1948) Oestradiol-17 β unverändert wiedergefunden.

Wir haben die Versuchsergebnisse von MIWA u. Mitarb. zu reproduzieren versucht. Dabei folgten wir in allem ihren Angaben, nur haben wir im Hinblick auf die von uns benutzten geringeren Mengen an zugesetztem Oestrogen das Volumen des Fermentansatzes entsprechend kleiner und die Dauer der Bebrütung entsprechend kürzer bemessen. Nachdem wir bei Verwendung des von den genannten Autoren verwandten Oestronbenzoats eine Reduktion nicht hatten feststellen können, haben wir die Untersuchung auch auf Oestronacetat und Oestron ausgedehnt. In jedem Fall wurde jedoch das eingewogene Oestrogen im ALLEN-DOISY-Test unverändert wiedergefunden. Dabei hätte die Aktivität unserer Fermentpräparate ausgereicht, um bei der gewählten Inkubationsdauer durchschnittlich das 100fache der eingesetzten Hormonmenge zu reduzieren. Weiter stellten wir fest, daß das Ferment auch Oestradiol-17 β nicht angreift. Die beschriebenen Resultate sind mit den Versuchsbeispielen 1 und 2 in Tab. 1 belegt. Unsere negativen Versuchsergebnisse konnten nun dadurch zustandegekommen sein, daß bei der Präparation der Succinodehydrogenase nach OHLSSON ein für die Oestronreduktion notwendiger Wasserstoffüberträger verlorengeht. Um diese Möglichkeit zu prüfen, haben wir Versuche mit gewaschenem Muskelbrei (Skelettmuskulatur vom Meerschweinchen) nach Zusatz von Succinat angestellt. Doch auch unter diesen Bedingungen wurde immer nur das eingesetzte Oestrogen (Oestron oder Oestronacetat) wiedergefunden.

2. *Wasserstoffübertragende Fermente der Glykolyse* (*Epidermis, Erythrocyten und Gärung* (*Hefe*)). Die wasserstoffübertragenden Fermente der Glykolyse und

¹ Herrn Prof. JUNKMANN sind wir sehr zu Dank verpflichtet.

Gärung waren als Vermittler der fermentativen Oestronreduktion in Betracht zu ziehen, da gerade von Zellen mit ausgeprägtem Vermögen zur Gärung bzw. Glykolyse, nämlich Hefezellen (MAMOLI 1938, WETTSTEIN 1939) und roten Blutzellen (BISCHOFF u. Mitarb. 1951), angegeben wird, daß sie zur Reduktion des Oestrone zu Oestradiol-17 β fähig sind.

Da es uns zunächst nur darauf ankam, festzustellen, ob der untersuchte Vorgang innerhalb des glykolytischen Abbaus der Glucose liegt, haben wir keinen Versuch gemacht, die in Frage kommenden Fermente zu isolieren. Für unsere orientierenden Versuche benutzten wir zunächst einfach Hautschnitte (Epidermis des Meerschweinchens), die für ihr relativ starkes Gärungsvermögen bekannt sind (WOHLGEMUTH u. KLOPSTOCK 1926). — Wir erhielten aber auch hier nach Inkubation mit Oestron oder Oestronacetat (3—15 Std) immer nur die eingewogenen Oestrogenmengen zurück (vgl. Versuchsbeispiel 3). Die Aktivität der Hautschnitte hätte an sich ausgereicht, um durchschnittlich das 100fache der eingesetzten Oestrogenmenge zu Oestradiol zu reduzieren. Im Hinblick

Tabelle 1.

Versuchs- beispiel	Ansatz	Eingewogene Oestrogendosis pro Tier γ	Prozentsatz oestrischer Tiere %
1	63 γ Oestronbenzoat	0,945	19
	63 γ Oestronbenzoat, 5 cm ³ Ferment- lösung aus Rinderherzen, 2 cm ³ 0,2 m Succinat. Inkubation: 24 Std	0,945	9
	51,2 γ Oestronacetat	0,768	10
	51,2 γ Oestronacetat, 5 cm ³ Ferment- lösung aus Rinderherzen, 2 cm ³ 0,2 m Succinat. Inkubation: 24 Std	0,768	12
2	45 γ Oestron	0,675	16
	45 γ Oestron, 5 cm ³ Fermentlösung aus Rinderherzen, 2 cm ³ 0,2 m Succinat. Inkubation: 24 Std	0,675	4
	45 γ Oestradiol-17 β	0,675	92
	45 γ Oestradiol-17 β , 5 cm ³ Fermentlösung aus Rinderherzen, 2 cm ³ 0,2 m Succinat. Inkubation: 24 Std	0,675	92
3	60 γ Oestronacetat, 10 g Hautschnitte. Inkubation: 0 Std	0,9	18
	60 γ Oestronacetat, 10 g Hautschnitte. Inkubation: 6 Std	0,9	21

auf dieses unerwartete Resultat haben wir die zitierte Beobachtung näher untersucht, nach welcher *gärende* Hefe Oestron oder Oestronacetat zu Oestradiol-17 β umsetzt. Diese Angabe konnten wir jedoch nur

Tabelle 2.

Versuchs- beispiel	Ansatz	Eingewogene Oestrogendosis pro Tier γ	Prozentsatz oestrischer Tiere %
4	60 γ Oestron	0,9	14
	60 γ Oestron, 5 cm ³ Blutserum. Inku- bation: 6 Std	0,9	10
	60 γ Oestron, 5 cm ³ Blut. Inkubation: 6 Std	0,9	78
	60 γ Oestradiol-17 β	0,9	86
5	50 γ Oestron	0,75	6
	50 γ Oestron, 2 cm ³ ungewaschener Ery- throcytenbrei, 0,9 cm ³ 0,3 m Trauben- zuckerlösung. Inkubation: 6 Std	0,75	90
	50 γ Oestron, 2 cm ³ gewaschener Erythro- cytenbrei, 0,9 cm ³ 0,3m Traubenzuckerlö- sung. Inkubation: 6 Std	0,75	80
	50 γ Oestron, 2 cm ³ gewaschener Erythro- cytenbrei, kein Traubenzuckerzusatz. Inkubation: 6 Std	0,75	38
6	50 γ Oestron	0,75	14
	50 γ Oestron, 3 cm ³ Erythrocytenbrei (mit Traubenzuckerzusatz). Inkubation: 6 Std	0,75	76
	50 γ Oestron, 3 cm ³ Erythrocytenbrei (mit Traubenzuckerzusatz), m/30 Na- triumcyanid (neutr.). Inkubation: 6 Std	0,75	70
	50 γ Oestradiol-17 β	0,75	92
7	50 γ Oestron	0,75	16
	50 γ Oestron, 6 cm ³ Hämolsat, 1 cm ³ 0,3 m Traubenzuckerlösung. Inkubation: 6 Std	0,75	14
	50 γ Oestron, 6 cm ³ Hämolsat, 1 cm ³ 0,3 m Glucose-6-phosphat-Lösung. Inku- bation: 6 Std	0,75	72
	50 γ Oestron, 6 cm ³ Erythrocytenauf- schwemmung, 1 cm ³ 0,3 m Trauben- zuckerlösung. Inkubation: 6 Std	0,75	94

insoweit bestätigen, als tatsächlich Oestradiol-17 β gebildet wird; wir fanden aber, daß der Vorgang keineswegs mit der Gärung verknüpft ist. Die Belege für diesen Befund werden wir in einer späteren Mitteilung bringen. Auch die Glykolyse in roten Blutzellen ist für den untersuchten Reduktionsprozeß ohne Bedeutung, wie im nachfolgenden Abschnitt gezeigt wird.

3. *Rote Blutzellen.* FEE u. Mitarb. (1929) und ZONDEK (1934) haben berichtet, daß Oestron vom Blut nicht affiziert wird. BISCHOFF u. Mitarb. (1951) gaben aber eine Aktivitätszunahme von Oestron nach Inkubation mit roten Blutzellen an. Im Gegensatz dazu fanden SILBERSTEIN u. Mitarb. (1934) und WERTHESSEN u. Mitarb. (1948, 1950, 1951) eine Zerstörung des Oestrone im Blut¹. — Die zitierten Autoren haben unter so abweichenden Versuchsbedingungen gearbeitet und so ungleichwertige Bestimmungsverfahren der Oestrogene benutzt, daß ihre Ergebnisse nicht miteinander verglichen werden können.

Jedenfalls waren diese widersprechenden Ergebnisse an sich nicht besonders verlockend zu einer weiteren Untersuchung; wir sind dennoch an diesem Versuchsobjekt dem bearbeiteten Problem zu Leibe gegangen, da die relativ einfache und gut untersuchte Fermentausrüstung der roten Blutzellen übersichtliche Verhältnisse garantierte.

Die erste Versuchsserie wurde mit Kaninchenblut durchgeführt. Wir fanden, daß nach Inkubation von Oestron mit defibriniertem Kaninchenblut die Extrakte eine stärkere oestrogene Wirksamkeit besaßen als der eingewogenen Oestronmenge entsprach. Die Auswertung im ALLEN-DOISY-Test ergab sogar unter geeigneten Versuchsbedingungen Ausschläge von derselben Größe wie die einer entsprechenden Standardlösung Oestradiol-17 β (vgl. Versuchsbeispiel 4 der Tab. 2). Da sonst keins der bekannten natürlichen Oestrogene eine stärkere oestrogene Wirksamkeit als Oestron besitzt, lag schon auf Grund dieses Ergebnisses die Schlußfolgerung nahe, daß es sich um die Bildung von Oestradiol-17 β handeln müsse. Wir sicherten diese Annahme durch Identitätsprüfungen mit Hilfe der Schmelzpunktbestimmung und der papierchromatographischen Analyse. Dazu wurden 20 mg Oestron mit 60 cm³ gewaschenem Erythrocytenbrei unter Zusatz von Traubenzucker 24 Std bei 37° C inkubiert. Daraus konnten nach dem beschriebenen Verfahren der Isolierung von Oestradiol 8,2 mg Substanz gewonnen werden. Der Schmelzpunkt des isolierten Produkts wurde bei 173—174° C gefunden (reines Oestradiol-17 β : 173—179° C); beim Vermischen mit reinem Oestradiol-17 β war keine Depression der Schmelzpunkttemperatur festzustellen. Das Diacetat unseres Reaktionsproduktes schmolz wie das Diacetat des reinen Oestradiol-17 β zwischen 120—125° C. Auf formamidgetränktem

¹ Nach Abschluß unserer Untersuchung wurde eine weitere Arbeit von BISCHOFF u. Mitarb. (1952) bekannt, in der nun auch diese Autoren mitteilen, daß rote Blutzellen unter gewissen Bedingungen Oestron bei Verlust der biologischen Aktivität zerstören.

Papier wanderten reines Oestradiol-17 β und unser Produkt gleich schnell ($R_f = 0,3$); im Mischchromatogramm verhielten sich reines Oestradiol-17 β und isolierte Substanz einheitlich. Die beiden Diacetate zeigten auf siliconbehandeltem Papier die gleichen R_f -Werte ($R_f = 0,42$).

Die Umsetzung von Oestron zu Oestradiol-17 β war bei den von uns benutzten Abmessungen (vgl. Versuchsbeispiele 4—7) frühestens in 6 Std beendet, wenn sich auch der Beginn der Reaktion schon nach einstündiger Inkubation nachweisen ließ. Die Umsetzung kam bei Anwesenheit wie auch nach weitgehender Vertreibung des Sauerstoffs aus dem Blut durch Einleiten von reinem Stickstoff zustande. Oestradiol-17 β wurde nicht angegriffen. — Für die Oestronreduktion zu Oestradiol-17 β waren die roten Blutzellen verantwortlich. Denn wir erhielten nach Inkubation mit Blutserum das eingewogene Oestron zurück (vgl. Versuchsbeispiel 4) und wir fanden serumfreie, mehrfach gewaschene rote Blutzellen unverändert wirksam, allerdings nur bei Zusatz von Traubenzucker (vgl. Versuchsbeispiel 5). Der letztere Umstand ließ darauf schließen, daß die Bildung von Oestradiol-17 β von einem fermentativen Prozeß im Kohlenhydratstoffwechsel abhängig ist. Die wasserstoffübertragenden Fermente der Glykolyse stehen allerdings mit dem Effekt nicht in Beziehung, denn Cyanidkonzentrationen, welche die Glykolyse hemmen (WARBURG 1946, MEYERHOF u. KAPLAN 1952), zeigten keinen Einfluß (vgl. Versuchsbeispiel 6). Dagegen blieb nach Inkubation von Oestron mit Hämolysat eine Wirksamkeitssteigerung der Extrakte aus und kam nur bei Zusatz von Glucose-6-phosphat wieder zustande (vgl. Versuchsbeispiel 7). Die naheliegende Schlußfolgerung, daß für die Reduktion von Oestron zu Oestradiol-17 β das cyanidunempfindliche Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem verantwortlich ist, wurde durch Versuche mit dem isolierten System gesichert, die in einer nachfolgenden Mitteilung beschrieben werden.

Die dargelegten Versuchsergebnisse wurden an roten Blutzellen vom Kaninchen gewonnen. Gleichartige Ergebnisse erhielten wir bei Verwendung von Erythrocyten des Meerschweinchens und auch des Menschen. Bei Verwendung von menschlichem Blut wurde allerdings eine verhältnismäßig lange Inkubationszeit für die Umsetzung benötigt. Das Blut von Mann und Frau zeigte bei orientierenden Vergleichsuntersuchungen keine verwertbaren Unterschiede in der Umsetzungsgeschwindigkeit von Oestron.

Diskussion.

Über die schon besprochenen Gesichtspunkte hinaus muß noch die Feststellung diskutiert werden, daß bei Inkubation mit roten Blutzellen Oestradiol-17 β nicht verändert und Oestron ganz vorwiegend oder ausschließlich zu Oestradiol-17 β umgesetzt wurde. An sich steht letztere Beob-

achtung mit der bekannten Tatsache in Einklang, daß auch bei der Hydrierung der Carbonylgruppe am C_{17} mit chemischen Mitteln Oestradiol- 17β das hauptsächliche Produkt ist. Verwunderlich erscheint aber unsere an roten Blutzellen des Kaninchens gemachte Feststellung im Hinblick darauf, daß bekanntlich Kaninchen nach Einspritzung von Oestron oder Oestradiol- 17β ganz vorwiegend Oestradiol- 17α ausscheiden (Literatur bei PEARLMAN 1948). Wir dürfen schließen, daß die roten Blutzellen für die Umwandlung von Oestradiol- 17β zu -17α im Kaninchenorganismus nicht von Bedeutung sind.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die ersten Versuche innerhalb einer Untersuchungsreihe, in welcher wir uns die Aufklärung des Fermentchemismus der Reduktion von Oestron zu Oestradiol- 17β zum Ziel setzten. Es wurde im Gegensatz zu den bisher vertretenen Vorstellungen gefunden, daß die Succinodehydrogenase und die wasserstoffübertragenden Fermente der Glykolyse dafür ohne Bedeutung sind. Dagegen konnten wir wahrscheinlich machen, daß der untersuchte Vorgang in roten Blutzellen vom Kaninchen, Meerschweinchen und Menschen durch das Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasesystem zustandegebracht wird. Oestradiol- 17β wurde als Reaktionsprodukt identifiziert durch Bestimmung der biologischen Aktivität im ALLEN-DOISY-Test, durch Feststellung der Schmelzpunkte sowie durch sein Verhalten bei der papierchromatographischen Analyse.

Literatur.

- BEHRENS, B., W. HEUBNER, W. KOLL u. F. KÜLZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **186**, 121 (1937). — BERSIN, T.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G. 1951. — BISCHOFF, F., R. E. KATHERMAN and Y. S. YEE: Amer. J. Physiol. **164**, 774 (1951). — BISCHOFF, F., R. E. KATHERMAN, V. FAVATI and CH. L. GRAY: Amer. J. Physiol. **171**, 100 (1952). — BRODIE, A. F., and J. S. GOTS: Science (Lancaster, Pa.) **114**, 40 (1951). — BRUGSCH, TH., W. HOHLWEG, H. SEEL u. I. HAHN: Pharmazie **7**, 811 (1952). — BUSH, J. E.: Nature (Lond.) **166**, 455 (1950). — DORFMAN, R. I., and F. UNGAR: Metabolism of Steroid hormones. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1953. — FEE, A. R., G. F. MARRIAN and A. S. PARKES: J. of Physiol. **67**, 377 (1929). — FIESER, L. F., and M. FIESER: Natural products related to phenanthrene. New York: Reinhold Publishing Corp. 1949. — FISHMAN, W. H.: Vitamins and Hormones (N. Y.) **9**, 213 (1951). — JAILER, J. W.: J. of Clin. Endocrin. **9**, 557 (1949). — MAMOLI, L.: Ber. **71**, 2696 (1938). — MARKWARDT, F.: Naturwissenschaften **6**, 139 (1954). — MARRIAN, G. F.: Endeavour **5**, 35 (1946). — DE MEIO, R. H., A. E. RAKOFF, A. CANTAROW u. K. E. PASCHKIS: Endocrinology **43**, 97 (1948). — MEYERHOF, O., and A. KAPLAN: Arch. of Biochem. a. Biophysics **37**, 375 (1952). — MIWA, T., M. ITO and S. HAYAZU: Klin. Wschr. **1940**, 954. — NEUBERG, C.: Biochem. Z. **88**, 432 (1918). — NEUBERG, C., and J. LEIBOWITZ: Biochem. Z. **184**, 489 (1927). — OHLSSON, E.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **41**, 72 (1921). — PEARLMAN, W. H.: The Chemistry and Metabolism of the Estrogens. In: The Hormones, hrsg. von G. PINCUS and K. V. THIMANN. New York, Academic Press Inc. 1948. Bd. I, 352ff. —

PINCUS, G., and W. H. PEARLMAN: *Endocrinology* **29**, 413 (1941); **31**, 507 (1942). — REPKE, K., u. F. MARKWARDT: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **222**, 222 (1954a). — REPKE, K., u. F. MARKWARDT: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* (im Druck 1954b). — McSHAN, W. H., R. K. MEYER and W. F. ERWAY: *Arch. of Biochem. a. Biophysics* **15**, 99 (1947). — SILBERSTEIN, F., K. MOLNAR u. P. ENGEL: *Klin. Wschr.* **1933**, 1694. — WARBURG, O.: *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*. Berlin: Saenger 1946. — WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: *Biochem. Z.* **242**, 206 (1931). — WERLE, E.: *Chemie* **56**, 305 (1943). — WERTHESEN, N. T., C. F. BAKER and B. BORCI: *Science (Lancaster, Pa.)* **107**, 64 (1948). — WERTHESEN, N. T., C. F. BAKER and N. S. FIELD: *J. of Biol. Chem.* **184**, 145 (1950). — WERTHESEN, N. T., C. F. BAKER and N. S. FIELD: *Amer. J. Physiol.* **167**, 166 (1951). — WETTSTEIN, A.: *Helvet. chim. Acta* **22**, 250 (1939). — WOHLGEMUTH, J., u. E. KLOPSTOCK: *Biochem. Z.* **175**, 202 (1926). — ZAFFARONI, A., R. B. BURTON and E. H. KEUTMANN: *Science (Lancaster, Pa.)* **111**, 61 (1950).

Doz. Dr. K. REPKE, Greifswald, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin (West).

Über protrahiert wirksame Corticoide.

Von

KARL JUNKMANN*.

(Eingegangen am 9. Juni 1954.)

In drei vorangehenden Arbeiten konnte über Androgene³, Oestrogene⁴ und Gestagene⁵ mit protrahierter Wirkung berichtet werden, die gegenüber anderen Lösungen des Problems protrahiert wirksamer Steroide³ Vorteile besitzen. Der Wunsch, auch bei den Corticoiden Depotwirkungen mit klaren Injektionslösungen zu erzielen, hat die nachstehende Untersuchung veranlaßt. Zum Vergleich der Wirkungsdauer der einzelnen Stoffe kamen die bekannten Stoffwechselwirkungen der Corticoide kaum in Betracht, da ihr Nachweis in langdauernden Versuchen mit recht erheblichen experimentellen Schwierigkeiten verknüpft ist. Eine rasche Durchprüfung wäre mit Hilfe von Stoffwechseluntersuchungen nicht möglich gewesen. Es wurde daher der katabole Einfluß, den die Glucocorticoide auf den Thymus ausüben^{1, 7} zur Beurteilung der Wirkungsdauer herangezogen.

Versuchsanordnung.

Zu den Versuchen wurden männliche infantile Ratten im Gewicht von 35—45 g verwendet. In Gruppen von je 5 Tieren erhielten sie Gaben von 0,5, 1, 2, 4 und 8 mg der zu untersuchenden Substanzen subcutan. 1, 2, 4 und 8 Tage nach der Injektion wurden jeweils Gruppen von 5 Tieren getötet und das Gewicht des frisch herauspräparierten Thymus ermittelt und, auf 100 g Tier umgerechnet, protokolliert. Das Durchschnittsgewicht des normalen Thymus liegt bei etwa 220 mg pro 100 g Tier.

V Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Sie enthält neben den Schmelzpunkten der geprüften Stoffe auch bei den schon bekannten Verbindungen einige Angaben über die beschreibende Literatur.

Aus ihr ist zu ersehen, daß die Verlängerung der veresternden Säuren in der 21-Stellung des Cortisons zu einer Verstärkung und Verlängerung der Wirkung führt. Als besonders günstig hinsichtlich Wirkungsintensität, Wirkungsdauer und Löslichkeit erwiesen sich das Cortison-21-n-önanthat und -caprylat und in etwas geringerem Maße das Cortison-21-n-undecylat. Wegen der guten Löslichkeit eines Gemisches von Cortison-önanthat und -undecylat in einem Gemisch von Ricinusöl und Äthyllactat

* Die in dieser Arbeit untersuchten Corticoidderivate wurden in der Abteilung des Herrn Dr. M. SCHENCK von Herrn Dr. E. KASPAR synthetisiert. Bei der Durchführung der Versuche unterstützten mich Frl. M. ARNDT und Fr. B. SUCHOWSKI.

Tabelle 1.

Präparat	Schmelzpunkt*	Literatur	Einmalige subcutane Gabe mg/ Tier	Gewicht des frischen Thymus mg/g nach Tagen			
				1	2	4	8
Cortison-21-acetat	236,0—239,0°	8	0,5	146	167	143	
			1,0	138	148	183	
			2,0	114	110	151	
			4,0	120	73	80	140
			8,0	116	51	50	93
Cortison-21-propionat	238,0—241,0°	6	0,5	105	93	100	229
			1,0	126	76	72	137
			2,0	109	58	78	140
			4,0	116	50	49	74
			8,0	140	53	36	46
Cortison-21-n-butyrat	189,5—191,0°		0,5	168	116	168	149
			1,0	131	104	101	152
			2,0	160	86	108	185
			4,0	156	96	91	136
			8,0	176	60	63	100
Cortison-21-n-capronat	129,5—131,5°		0,5	199	197	157	208
			1,0	136	105	113	181
			2,0	98	74	72	144
			4,0	114	61	60	85
			8,0	63	55	41	61
Cortison-21-n-önanthat	138,5—140,0°		0,5			112	
			1,0	148	71	100	177
			2,0	142	74	65	109
			4,0	153	54	46	97
			8,0	128	42	52	80
Cortison-21-n-caprylat	139,0—141,0°	6	0,5	110	92	106	158
			1,0	88	79	76	136
			2,0	107	60	64	99
			4,0	108	55	53	92
			8,0	100	49	44	67
Cortison-21-n-undecylat	111,5—113,0°		0,5	114	103	115	184
			1,0	105	102	90	155
			2,0	112	53	50	68
			4,0	113	51	40	54
			8,0	93	38	35	52
Cortison-21-n-undecylenat	108,0—109,0°		0,5	129	133	179	242
			1,0	134	109	122	245
			2,0	97	96	109	219
			4,0	82	93	91	149
			8,0	93	65	60	96

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Präparat	Schmelzpunkt*	Lite- ratur	Ein- malige subcuta- ne Gabe mg/ Tier	Gewicht des frischen Thymus mg/g nach Tagen			
				1	2	4	8
Cortison- 21-diäthylacetat	167,0—167,5°		0,5	174	143	192	236
			1,0	157	125	133	266
			2,0	137	89	110	216
			4,0	160	95	84	94
			8,0	165	67	71	130
Cortison-21-adipi- nat-äthylester	143,0—146,0°		0,5	184	119	152	190
			1,0	182	127	132	183
			2,0	199	121	106	153
			4,0	171	99	98	167
			8,0	160	91	77	138
Cortison- 21-benzoat	245,5—247,0°		0,5	170	165	183	259
			1,0	141	119	141	189
			2,0	120	97	70	161
			4,0	121	79	70	77
			8,0	121	89	72	106
Cortison- 17,21-diacetat	215,0—216,5°	2,9	0,5	297	187	242	256
			1,0	235	160	188	230
			2,0	204	118	154	201
			4,0	198	95	93	156
			8,0	215	72	62	94
Cortison-17,21-di- acetat-3-enolacetat	165,5—168,5°		0,5	228	192	186	250
			1,0	180	124	167	218
			2,0	178	118	161	185
			4,0	128	105	169	129
			8,0	144	96	104	181
Cortison-17,21- dipropionat-3- enolpropionat	120,5—123,0°		0,5	280	256	209	225
			1,0	257	194	196	260
			2,0	219	202	225	196
			4,0	221	187	201	224
			8,0	213	116	186	196
Cortison-21-acetat 3-monoxim	231,0—234,0°		0,5	123	111	120	149
			1,0	89	88	88	153
			2,0	111	82	87	142
			4,0	110	57	58	113
			8,0	128	42	52	80
Cortison-21-acetat- 3-oximbutyrat	173,0—175,0°		0,5	86	102	125	164
			1,0	97	78	81	148
			2,0	93	64	74	122
			4,0	86	92	95	89
			8,0	212	72	60	103

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Präparat	Schmelzpunkt *	Literatur	Einmalige subcutane Gabe mg/ Tier	Gewicht des frischen Thymus mg/g nach Tagen			
				1	2	4	8
Hydrocortison	208,0—209,5°	8	0,5	145	100	162	182
			1,0	126	88	128	178
			2,0	120	80	105	186
			4,0	98	74	82	167
			8,0	135	64	45	97
Hydrocortison- 21-acetat	217,0—218,5°	8	0,5	167	126	127	199
			1,0	118	101	103	178
			2,0	121	99	99	153
			4,0	126	80	58	84
			8,0	94	66	57	97
Hydrocortison- 21-caprylat	115,5—116,5°		0,5	145	112	173	277
			1,0	159	75	114	200
			2,0	137	93	91	152
			4,0	123	70	76	167
			8,0	152	70	73	157
Hydrocortison- 21-caprinat	130,0—131,0°		0,5	130	153	145	286
			1,0	115	133	103	200
			2,0	116	112	103	145
			4,0	103	74	77	85
			8,0	126	69	66	88
Hydrocortison- 21-undecylat	121,5—122,0°		0,5	122	112	143	178
			1,0	107	92	112	141
			2,0	109	91	91	108
			4,0	109	59	69	108
			8,0	88	63	43	83

* Alle Schmelzpunkte unkorrigiert in offenem Röhrchen genommen. Etwa 20° unter dem Schmelzpunkt eingesetzt. Temperatursteigerung 4° C je min.

wurde eine 25%ige Lösung des Gemisches dieser beiden Ester in dem genannten Lösungsmittel für die klinische Prüfung gewählt. Die klinischen Versuche haben die nach den Tierversuchen zu erwartende Verlängerung der Wirkungsdauer gegenüber dem Cortisonacetat bestätigt.

Das 17,21-Diacetat des Cortisons zeigt schon eine abgeschwächte Wirksamkeit, während das 17,21-Diacetat-3-enol-acetat und das 17,21-Dipropionat-3-enol-propionat praktisch fast wirkungslos sind und in niedriger Dosierung eher zu einer Erhöhung des Thymusgewichtes führen als zu einer Senkung. Einige stickstoffhaltige Derivate des Cortison-21-acetats haben zwar deutliche Protraktionswirkung, kommen aber wegen ihrer schlechten Löslichkeit für eine praktische Verwendung kaum in Frage.

Beim 11-Dihydrocortison war die Verlängerung des veresternden Acyls in 21-Stellung weniger wirksam als beim Cortison, so daß wenigstens vorläufig von einer praktischen Erprobung der Hydrocortisonester abgesehen wurde.

Hinsichtlich der theoretischen Erklärung der verlängerten Wirkungs-dauer der höheren Cortisonester gelten dieselben Überlegungen, wie sie bei den protrahiert wirksamen Androgenen³ angestellt wurden. Es soll aber auch hier vorläufig zwischen den theoretisch denkbaren Möglichkeiten keine Entscheidung getroffen werden.

Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung einer Reihe von Derivaten des Cortisons und Hydrocortisons hinsichtlich der Intensität und Dauer ihrer Wirkung auf das Thymusgewicht der infantilen männlichen Ratte wurde ein Gemisch des Cortison-21-n-önanthats und Cortison-21-n-undecylats als gut und langdauernd wirksamer Corticoide ausgewählt und in klarer Lösung in einem Gemisch von Ricinusöl und Äthyllactat zur klinischen Prüfung vorgeschlagen. Der Erfolg der Veresterung von Hydrocortison mit langkettigen Acylen hinsichtlich Wirkungsintensität und Dauer ist nicht so ausgesprochen, wie beim Cortison. 17,21-Diester des Cortisons und deren 3-Enolester kommen für eine praktische Verwendung als Depotcorticoide vorläufig nicht in Betracht.

Literatur.

- ¹ DOUGHERTY, T. F., and A. WHITE: *Endocrinology* **35**, 1 (1944). — ² HUANG-MINLON, E. WILSON, N. L. WENDLER and M. TISHLER: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5394 (1952). — ³ JUNKMANN, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmak.* **215**, 85 (1953). — ⁴ JUNKMANN, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **220**, 358 (1953). — ⁵ JUNKMANN, K.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* (im Druck). — ⁶ MACEK, T. J., W. H. BAADE, A. BORNN and F. A. BACHER: *Science (Washington)* **116**, 399 (1952). — ⁷ MONEY, W. L., J. FAYER and R. W. RAWSON: *Cancer Res.* **12**, 206 (1952). — ⁸ SHOPPEE, C. W.: *Ann. Rev. of Biochemistry* **22**, 261 (1953). — ⁹ TURNER, R. B.: *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 3489 (1953).

Prof. Dr. KARL JUNKMANN, Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. BEHRENS).

Die dromotrope Coffeinwirkung am Herzmuskel des Frosches als Kalium-Sensibilisation.

Von
HANS FRIEDRICH BENTHE.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Mai 1954.)

Neben den zahlreich beschriebenen zentralbedingten Einflüssen des Coffeins auf die Herzfunktionen liegen nur wenige Angaben über den direkten Angriff des Coffeins am isolierten Herzen vor. Zumindest ist nicht klar unterschieden zwischen den einzelnen Funktionsäußerungen; Reizbildung, Erregbarkeit, Reizleitung und Kontraktion.

Am isolierten Froschherzen hat JUNKMANN (1923) eine Frequenzsteigerung bei 0,04—0,08% Coffeinzusatz festgestellt. Dieser Effekt soll über eine Beeinflussung der Reizbildung zustandekommen. Nach NEUROTH, WEZLER u. SIEGLITZ (1953) erreicht die Frequenzerniedrigung unter steigenden Belastungsdrücken bei Coffeinzugabe nur ungefähr 50% des Wertes, der bei der gleichen Belastung ohne Coffein beobachtet wird. Da eine atrioventrikuläre Ligatur diesen Coffeineffekt aufhebt, schließen die Autoren, daß die positiv chronotrope Coffeinwirkung vom supraventrikulären Reizbildungsgeewe ihren Ausgang nimmt.

Damit ist aber keineswegs eine parallelgehende Coffeinwirkung auf die Erregungslage der Kammermuskulatur ausgeschlossen, und in den folgenden Untersuchungen wird gezeigt werden, daß ein klarer Einfluß auf die Erregungsleitungsgeschwindigkeit des Herzmuskels besteht, der in Wirkungsart und Wirkungsstärke jedoch abhängig ist vom Kaliumgehalt der Nährflüssigkeit. Hierbei sind die ausgeprägten und häufig beschriebenen Eigeneffekte des Kaliums zu berücksichtigen.

Neben der bekannten Neigung zu diastolischem Stillstand unter Kaliumüberschuß erwähnen schon BURGH u. CLARK (1921) eine Zunahme der Kontraktionen und eine Erschwerung der Überleitung und intraventrikulären Leitung bei Kaliumverringern. Exakte Messungen des K-Einflusses auf die Erregungsleitungsgeschwindigkeit des Herzmuskels sind dann von BAMMER u. ROTHSCUH (1952) durchgeführt worden: bei Erniedrigung der normalen K^+ -Konzentration ergibt sich eine Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit, bei mäßiger Erhöhung eine Zunahme, während bei starker Erhöhung des K^+ -Gehaltes die Leitung erlischt.

Die von uns durchgeführte vergleichende Untersuchung des Kalium- und Coffeineinflusses sollte klären, ob die Coffeinwirkung als Kaliumsensibilisation zu deuten ist. Denn aus den umfangreichen Arbeiten von GOFFART u. BACQ (1952) geht hervor, daß Coffein zu den Kaliumsensibilisatoren zu rechnen ist. Bei den dort angewandten Identifizierungs-

methoden steht die KCl-Verkürzung des Froschrectus im Vordergrund, die im positiven Falle durch die zu prüfenden Substanzen verstärkt wird. Für die Kontraktionen des Froschherzens finden DEROUAUX u. BACQ (1941) eine Verstärkung der hemmenden Kaliumwirkung durch Veratrin, Sulfoeyanid und Aconitin; nach GOUTIER (1949) sind in entsprechender Weise auch Methylxanthine wirksam. Soweit bekannt, liegen Untersuchungen über den Einfluß von Kaliumsensibilisatoren auf die Erregungsleitungsgeschwindigkeit nicht vor.

Unsere Arbeit soll einmal einen Beitrag liefern zur Kenntnis der Coffeinwirkung auf den Herzmuskel, zum anderen prüfen, ob das Phänomen der Kaliumsensibilisation auch für die Erregungsleitung besteht.

Methodik.

Die Messung der Erregungsleitung am Herzmuskel des Frosches ermöglicht ein von BAMMER u. ROTHSCUH (1952) angegebenes Verfahren. Dabei wird aus der Herzkammer in spiraliger Schnittführung ein ungefähr 1 mm dicker und 40 mm langer Streifen hergestellt. Nach Entfernung des reizbildenden Gewebes unter dem Binokular zeigten die Streifen im allgemeinen keine Spontanätigkeit mehr. Bis zum Versuchsbeginn wurde ungefähr 6 Std gewartet, während dieser Zeit befanden sich die Streifen im Kühlschrank in einer RINGER-Lösung folgender Zusammensetzung: 100 H₂O, 0,6 NaCl, 0,021 KCl, 0,024 CaCl₂, 0,03 NaHCO₃. Kurz vor dem Versuch kamen die Streifen in die gleiche RINGER-Lösung von Zimmertemperatur. Die Festlegung des Streifens erfolgte durch 2 mit RAMSAY-Fett bestrichene Paraffinbälkchen, die auf die eingekerbten Seitenwände der Badkammer gesetzt wurden. Die Kammer hatte eine Länge von 2,5 cm und ein Volumen von 3 cm³. Als Reiz- und Ableitelektroden verwendeten wir 0,2 mm starke Platindrähte. Zur Reizauslösung dienten Kondensatorentladungen, ein EKG-Gerät registrierte die Aktionspotentiale auf Papierfilm, dessen Geschwindigkeit 3,5 cm/sec betrug, welche bei jedem Versuch kontrolliert wurde. Ungefähr 30 min nach Einbetten des Streifens hatte sich die Leitungsgeschwindigkeit auf einen konstanten Wert eingestellt, erst dann

begannen die Messungen. Die Untersuchungen wurden ausgeführt in den Monaten November—März an *Rana temporaria*; die Tiere befanden sich bei kühler Aufbewahrung im Winterschlaf, so daß sich jahreszeitlich echt verhaltenes Material in den Versuch kam.

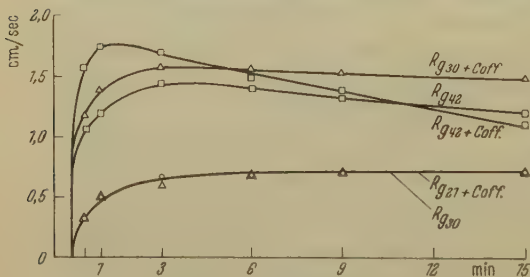


Abb. 1. 21 bis 42 mg% KCl.

Abb. 1—3. LG-Änderung cm/sec (Ordinate) in RINGER-Lösungen mit verschiedenen KCl-Gehalten, mit und ohne Coffein. Ausgangslösung mit 21 mg% KCl.

Abszisse: Einwirkungszeit.

Ergebnisse.

1. Ausgangs-RINGER-Lösung mit 21 mg% KCl.

In einer ersten Versuchsreihe sollte die Änderung der Leitungsgeschwindigkeit

(LG) bei Einfluß einer 0,08% Coffein-RINGER-Lösung festgestellt werden, wobei die RINGER-Lösung verschiedene KCl-Konzentrationen enthielt; insgesamt wurden 9 verschiedene RINGER-Lösungen mit folgenden

KCl-Gehalten geprüft: 5, 10, 15, 21, 30, 42, 50, 60, 70 mg% KCl. Die Ausgangswerte wurden jeweils in der Aufbewahrungslösung mit 21 mg% KCl gewonnen und betragen im Durchschnitt 7 cm/sec. Danach erfolgte der Wechsel der Badflüssigkeit; die Einwirkungszeit betrug 15 min, im allgemeinen hatte die LG dann einen konstanten Wert erreicht, wenn man von schädigenden Konzentrationen absieht. Während dieser Zeit wurde die LG laufend gemessen, die erste Messung erfolgte 30 sec nach Applikation. Um die eingangs erwähnten Eigeneffekte des Kaliums zu berücksichtigen, wurden in einer parallelgehenden Versuchsreihe jeweils auch die coffeinfreien RINGER-Lösungen geprüft. Für jede Prüflösung wurde ein neuer Herzstreifen hergestellt.

Die LG-Änderung bei Erhöhung der K^+ -Konzentration (> 21 mg%) ist in Abb. 1 u. 2 dargestellt, während Abb. 3 in entsprechender Weise für erniedrigte K^+ -Konzentrationen gilt. Die Abszisse gibt die Einwirkungszeit an, die Ordinate die Zu- bzw. Abnahme der LG. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte aus durchschnittlich 10–15 Versuchen. Zur Kennzeichnung der einzelnen RINGER-Lösungen (Rg) sind ihre KCl-Gehalte in mg% als Indices angegeben.

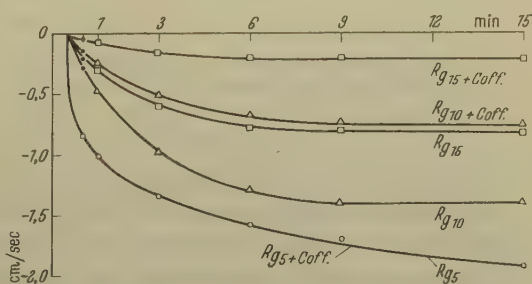
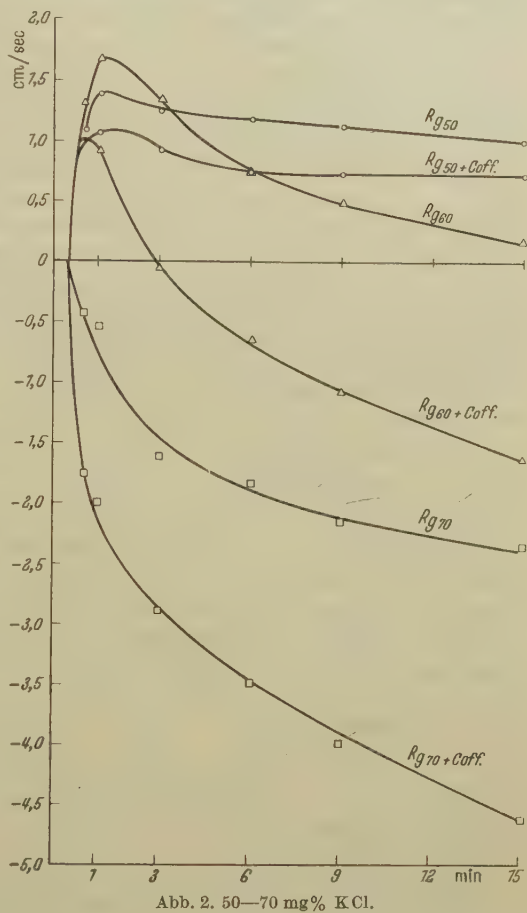


Abb. 3. 15–5 mg% KCl.

Wie die Abb. 1 zeigt, haben Rg_{30} und $Rg_{21+CoFF}$ identischen Einfluß auf die LG. Dieser fördernde Coffeineffekt macht sich am stärksten bei $Rg_{30+CoFF}$ bemerkbar. Bei 42 mg% KCl ist bereits eine zweiphasige Kaliumwirkung angedeutet, indem der nach 3 min erreichte Maximalwert nicht gehalten, sondern unterschritten wird. Ein Coffeinzusatz führt zunächst zu einer stärkeren Zunahme, aber bereits nach 10 min überschneiden sich beide Kurven, hier verstärkt Coffein den depressiven Kaliumeffekt. Dieser Zusammenhang wird deutlicher bei weiterer Erhöhung des KCl-Gehalts (Abb. 2). Schon bei 50 mg% KCl bewirkt ein Coffeinzusatz, daß der absolute Betrag der LG-Zunahme kleiner ist als der der coffeinfreien Vergleichslösung. Das gilt auch für die folgenden höheren KCl-Konzentrationen. 60 mg% KCl erhöhen auch nach 15 min Einwirkung noch die LG, während bei Coffeinzugabe die LG schon nach 3 min in eine Abnahme umschlägt. Bei Rg_{70} und $Rg_{70+CoFF}$ unterbleibt jede Erhöhung der LG, die Abnahme wird durch Coffein erheblich verstärkt, bei ungefähr 30% der untersuchten Herzstreifen erlischt bei dieser Konzentration die Leitfähigkeit.

Eine Senkung der LG tritt jedoch nicht nur bei sehr hohen K^+ -Konzentrationen auf, sondern auch bei Unterschreiten des K^+ -Gehalts der Ausgangslösung. Abb. 3 zeigt dies für Rg_5 , Rg_{10} und Rg_{15} . Dieser den hohen Dosen gleichsinnige Einfluß wird aber durch Coffein nicht verstärkt, sondern gemildert. Bei 5 mg% KCl erweist sich Coffein jedoch als wirkungslos, ein bestimmter nicht zu unterschreitender K^+ -Gehalt der RINGER-Lösung ist also für die Coffeinwirkung erforderlich.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß die gleiche Coffein-Konzentration in Abhängigkeit vom KCl-Gehalt der RINGER-Lösung verschieden wirkt: bei 21, 30 und 42 mg% erhöht sich unter Coffein das Maximum der Leitungswerte, bei höheren Konzentrationen wird die schon bei coffeinfreier Lösung sich abzeichnende Senkung verstärkt, Coffein und erhöhte K^+ -Konzentrationen wirken hier gleichsinnig. Im Gegensatz dazu schwächt Coffein den verlangsamenden Einfluß erniedrigter K^+ -Konzentrationen ab, hier liegt ein gegensinniges Wirkungsverhältnis vor.

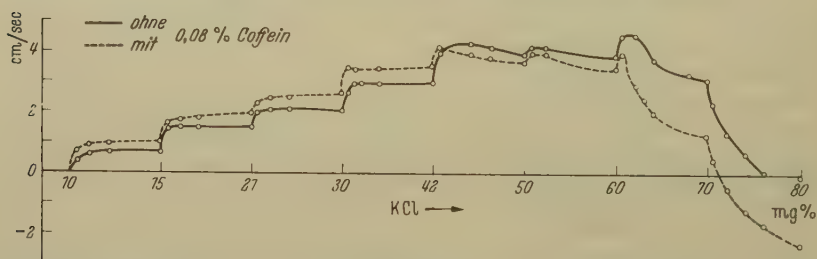


Abb. 4. LG-Änderung (cm/sec) bei stufenweiser Erhöhung des KCl-Gehalts mit und ohne Coffein. Ausgangs-RINGER-Lösung 5 mg% ○-----○ mit Coffein, —○—○ ohne Coffein.

2. Ausgangs-RINGER-Lösung mit 5 mg% KCl.

Ausgehend von einer RINGER-Lösung mit 5 mg% KCl sollte am selben Herzstreifen der Einfluß einer 0,08 % Coffeinelösung bei allmählicher stufenweiser Erhöhung des K^+ -Gehalts geprüft werden, wobei die Einwirkungszeit jeder Lösung wieder 15 min betrug. Da 5 mg% KCl offenbar die untere Grenzkonzentration darstellt, wurde neben einer starken

Senkung der LG darüberhinaus in fast 50% aller Fälle eine Blockierung der Erregungsleitung schon innerhalb der Einwirkungszeit von 15 min beobachtet. Entsprechend war eine mehrstündige Aufbewahrung in Rg_5 stets mit Verlust der Leitfähigkeit verbunden. Aus zehn gleichartig verlaufenden Versuchen sei ein Ergebnis in Abb. 4 wiedergegeben.

Wie die Abbildung zeigt, vermag Coffein nur die ohnehin schon durch Kalium bedingten Veränderungen zu verstärken, dies gilt sowohl für den leitungsfördernden Bereich (bis 42 mg%), als für die höheren hemmenden Konzentrationen. Auch hier überschneiden sich bei einem KCl-Gehalt von 42 mg% beide Kurven.

3. Quantitative Abhängigkeit zwischen LG-Änderung und Außenlösung.

In einer dritten Versuchsreihe sollte die quantitative Beziehung zwischen Kalium-Außenkonzentration und LG-Änderung und zugleich die Beeinflussung dieses Verhältnisses durch Coffein untersucht werden. Zu diesem Zweck wählten wir als Ausgangslösung wieder Rg_5 und erhöhten

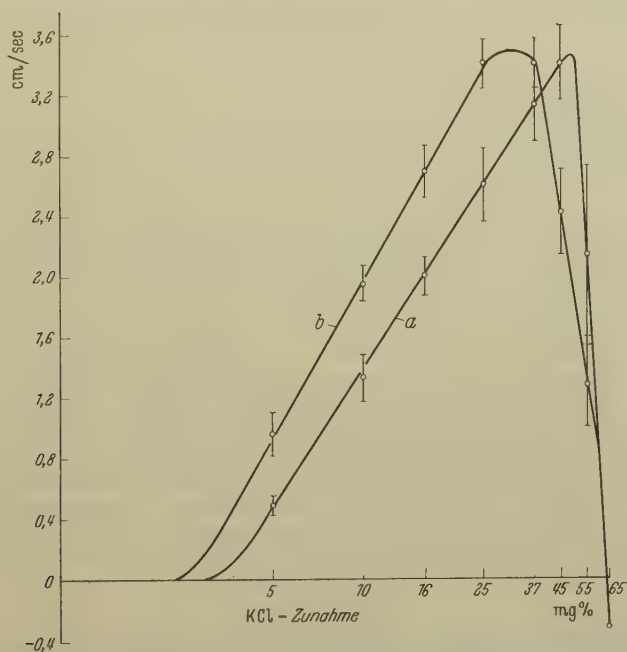


Abb. 5. Abhängigkeit der LG-Änderung (cm/sec) von der KCl-Vermehrung (mg%),
Abszisse log. a ohne Coffein, b mit Coffein.

anschließend den KCl-Gehalt stufenweise mittels obengenannter RINGER-Lösungen, wobei jede Lösung wieder 15 min einwirkte. Für die Auswertung wurde die jeweils nach dieser Zeit ermittelte LG herangezogen. In Abb. 5 ist die Zunahme der LG in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der KCl-Konzentration der RINGER-Lösung aufgetragen;

ferner die entsprechende Kurve für 0,08% Coffein-RINGER-Lösungen. Die eingezeichneten Werte sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Abweichungen.

Wie die Kurve a zeigt, ist die Zunahme der LG direkt proportional dem log des KCl-Gehaltes bei nicht toxischen Konzentrationen (bis 42 mg%). Bei Überschreiten dieser Konzentration erfolgt ein plötzlicher Abfall. Diese Beziehung bleibt auch bei Zusatz von Coffein erhalten, wie Kurve b zeigt, die sich von a neben wenig erhöhter Steigung nur durch Parallelverschiebung unterscheidet. Dieser Unterschied ist im vor-toxischen Bereich signifikant, wie aus der Tab. 1 hervorgeht.

Tabelle 1. Statistische Absicherung (nach FISHER) der Differenz zwischen LG-Zunahme bei KCl-Vermehrung mit und ohne Coffeinzusatz; n — Zahl der Freiheitsgrade.

KCl-Zunahme mg%	5:Coff	n	10:Coff	n	16:Coff	n	25:Coff	n	37:Coff	n
k	2,79	20	3,30	16	3,43	24	2,84	14	0,86	20
P	< 0,02		< 0,01		< 0,01		< 0,02		= 0,4	

Die Beziehung zwischen LG-Zunahme (Δv) und KCl-Zunahme kann im linearen Bereich durch $v - a \cdot \log \text{KCl} - b$ beschrieben werden. Unter Coffein ergibt sich dagegen:

$\Delta v_{\text{Coff}} = (a + 0,14) \cdot \log \text{KCl} - (b + 0,09)$, die Coffeinwirkung besteht demnach nur in einer Verstärkung des Kaliumeffektes bei Wahrung des logarithmischen Wirkverhältnisses, denn es ändern sich nur die Konstanten der obigen Funktion.

Bei einer KCl-Vermehrung um 37 mg% tritt kein signifikanter Coffein-einfluß in Erscheinung, obwohl deutlich ist, daß unter Coffein bereits die depressive Phase des Kaliums erreicht ist, während die entsprechende coffeinfreie Lösung noch leitungsfördernd wirkt. Wenn auch die Maximalwerte der LG in beiden Lösungen gleich groß sind, so unterscheidet sich doch die konzentrationsabhängige Form des Umkehrbereiches: der scharfe Abfall der LG wird durch Coffein gemildert.

Diskussion.

Mit den vorliegenden Befunden ist der Nachweis erbracht, daß Coffein die LG des Herzmuskels erhöht, und daß diese Wirkung durch Kaliumsensibilisation zustandekommt. Eine kaliumarme 0,08% Coffein-RINGER-Lösung ist wirkungslos am Herzmuskel, während der quer-gestreifte Muskel bei dieser Konzentration unabhängig vom Kalium-gehalt unter irreversibler Quellung depolarisiert. Die auffallend hohe Resistenz des Herzmuskels gegenüber Coffein, die schon Bock (1920) erwähnt, wird hiermit bestätigt. Zugleich wird es damit möglich, die

Forderung von BACQ (1939) zu erfüllen, daß gegen Kalium sensibilisierende Substanzen in solchen Konzentrationen untersucht werden müssen, die selbst keine Veränderungen machen.

Bei einer Klärung des möglichen Wirkungsmechanismus einer Kaliumsensibilisation müssen die umfangreichen Arbeiten auf diesem Gebiet berücksichtigt werden, deren theoretische Folgerungen jedoch in den meisten Fällen von der verstärkten Muskelverkürzung, also einer mechanischen Reaktion, ausgehen und daher für unsere Befunde nur bedingte Anwendung finden können. Nach BACQ ist nicht nur der absolute Kaliumgehalt entscheidend, sondern das Verhältnis $\frac{K + Na}{Ca + Mg}$. Da wir nur den Kaliumgehalt veränderten, wird das Verhältnis proportional zum absoluten Kaliumgehalt variiert. — Nach KUFFLER (1945) ist an der isolierten Muskelfaser ein Veratrineinfluß auf die mechanische Reaktion sichtbar, ohne die Reizschwelle zu ändern. Über Änderungen der Erregbarkeit durch Kaliumsensibilisatoren liegen keine eindeutigen Angaben vor (vgl. GOFFART u. BACQ 1952). — VANREMOORTERE u. Mitarb. (1950) erklären die Erhöhung der Frequenz des „Kaliumtetanus“ mit einer Verkürzung der Refraktärzeit durch die Kaliumsensibilisatoren. Diese Erklärungsmöglichkeit entfällt für die von uns festgestellte Sensibilisation, denn da wir mit Einzelreizen arbeiteten, konnte die Refraktärzeit nicht zum begrenzenden Faktor der LG werden.

Bei der Deutung der eigenen Befunde möchten wir ausgehen von dem eigentlichen Grundprozeß: der Kaliumwirkung, die durch Coffein lediglich in quantitativer Hinsicht modifiziert wird. Wir fanden einen linearen Anstieg der LG in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Kalium-Außenkonzentration.

Von HUXLEY u. STÄMPFLI (1950) ist am Riesenaxon von *Loligo* experimentell nachgewiesen, daß das Membranpotential linear abfällt mit dem dekadischen Logarithmus steigender Kalium-Außenkonzentrationen, womit das Membranpotential als Diffusionspotential des Kalium bestätigt wurde. ROTHSCUH (1952) hat in eingehenden Untersuchungen festgestellt, daß der Herzstreifen nach einer Erholungszeit als ein Geflecht unverletzter elektrophysiologisch intakter Zellen anzusehen ist. Für die Einzelzelle sind daher die gleichen Annahmen zu machen wie für jede andere erregbare Zelle, das gilt auch hinsichtlich des Membranpotentials und des Erregungsablaufs.

Bei der Fortleitung der Erregung ist außer der schwellenwertigen Depolarisation des Einzelelements ein Übergreifen auf die Nachbarzelle erforderlich. Demnach fördern alle Eingriffe, welche die Reizschwelle senken, die Erregungsleitung, so z. B. eine Erniedrigung des Membranpotentials. Unser Befund der $\log K^+$ -Abhängigkeit der Erregungsleitung macht es sehr wahrscheinlich, daß der fördernde Einfluß begrenzt steigender K^+ -Konzentrationen über eine Erniedrigung des Membranpotentials zustandekommt. Die quantitative Modifikation durch Coffein ist dann

lediglich eine konstante Zusatzdepolarisation und die Grundfrage der Kaliumsensibilisierung wird zu einer Frage der Zellpermeabilität.

Aus der Literatur sind Arbeiten bekannt, die ebenfalls zur Diskussion der Zellpermeabilität veranlaßten. GOFFART u. PERRY (1951) führen die kaliumdesensibilisierende Wirkung des Adrenalins auf eine Permeabilitätsverminderung zurück. Auf dem gleichen Wege wirken Antihistaminkörper, Lokalanästhetika und Ca^{++} (FLECKENSTEIN 1950). Die Frage, ob die Sensibilisierung auf einem umgekehrten Prozeß beruht, wird verschieden beantwortet. MOSERA (1947, 1948) fand am Froschmuskel keinen Zusammenhang mit der Permeabilität. Neben anderen kontrakturerzeugenden Substanzen ist von FLECKENSTEIN (1950) auch für das Coffein (0,125%) eine fast vollständige Depolarisation des M. rectus nachgewiesen. Diese Coffeinkonzentration stellt jedoch einen mit starker Quellung verbundenen irreversiblen toxischen Eingriff in die Muskelmembran dar und die damit notwendig verbundene depolarisierende Eigenschaft kann deshalb zur Klärung der von uns beobachteten Coffeineffekte am Herzmuskel, die vollständig reversibel sind, nicht unmittelbar herangezogen werden.

Schließlich ist neben dem diskutierten „passiven“ Wirkungsweg des Coffeins an seine cholinesterase-hemmende Eigenschaft zu denken (HEIM u. REIM 1949). Denn nach neuen Befunden ROTHSCHEHS (1954) werden bei Präparation des Herzstreifens nicht unbedeutende Mengen Acetylcholin aus einem Pro-ACh-Depot freigesetzt, und von BAMMER u. ROTHSCHEH (1951) ist die positiv dromotrope ACh-Wirkung am Herzstreifen nachgewiesen.

Es bleibt somit zu prüfen, ob sich die Annahme einer permeabilitätsverändernden Coffeinwirkung am Herzmuskel durch Potentialmessung und quantitative Erfassung der Kaliumverschiebungen bestätigen läßt. Am quergestreiften Froschmuskel haben MOND u. NETTER (1930) gefunden, daß bei einer Durchströmungsflüssigkeit mit 10 mg% Kalium keine Veränderung des Kaliumspiegels eintrat. Diese Konzentration entspricht ungefähr der von uns angewandten RINGER-Lösung mit 21 mg% KCl, die sich als die günstigste Aufbewahrungslösung erwies. Die zunehmenden Schwankungsbreiten (Abb. 5) bei steigenden KCl-Konzentrationen weisen auf individuell verschiedene Reaktionen des Herzmuskels hin, die wohl mit Kaliumaufnahme verbunden sind, wie es auch für den quergestreiften Muskel nachgewiesen ist (MOND u. NETTER). Der Eingriff des Coffeins in diese Verschiebungen ist nach den Arbeiten MALORNYS (1951, 1952) wahrscheinlich, der am Skelettmuskel unter höheren Coffeindosen einen Kaliumaustritt festgestellt hat.

Zusammenfassung.

1. Eine 0,08% Coffein-RINGER-Lösung verändert die Erregungsleitungsgeschwindigkeit des Herzmuskels. Dieser Effekt ist abhängig vom Kaliumgehalt der RINGER-Lösung: bei 5 mg% KCl ist Coffein wirkungslos, die maximale Erhöhung um $3,6 \text{ cm/sec} = 70\%$ wird bei 30 mg% KCl erreicht.

2. Der festgestellte vergleichende Einfluß des Kaliums ergibt, daß die Coffeinwirkung in einer Sensibilisierung der Kalium-Eigeneffekte besteht,

das gilt für leitungsfördernde KCl-Konzentrationen und für die höheren hemmenden Konzentrationen.

3. Die Zunahme der Leitungsgeschwindigkeit erfolgt im vortoxischen Bereich (bis 42 mg%) linear in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der KCl-Außenkonzentration. Coffein modifiziert dieses Verhältnis nur in quantitativer Hinsicht.

Literatur.

BACQ, Z. M.: Arch. internat. Pharmacodynamic **63**, 59 (1939). — BAMMER, H., u. K. E. ROTHSCHUH: Verh. dtsch. Physiol. Ges. Mainz 1951. — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **214**, 367 (1952). — Z. exper. Med. **119**, 402 (1952). — BOCK, J.: Heffter Hdb. d. exper. Pharmacol. II/1, 508, Springer-Verlag 1920. — BURGH, D., and H. CLARK: J. of Physiol. **54**, 367 (1921). — DEROUAUX, G., et Z. M. BACQ: Acta Biol. Belgica **2**, 248 (1941). — FLECKENSTEIN, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 54 (1950). — GOFFART, M., u. Z. M. BACQ: Erg. Physiol. **47**, 554 (1952). — GOFFART, M., and W. M. PERRY: J. of Physiol. **112**, 95 (1951). — GOUTIER, R.: Arch. internat. Physiol. **57**, 154 (1949). — HEIM, F., u. R. REIM: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **207**, 703 (1949). — HUXLEY, A. F., u. R. STÄMPFLI: Helvet. physiol. Acta **8**, 107 (1950). — JUNKMANN, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **96**, 63 (1923). — KUFFLER, S. W.: J. of Neurophysiol. **8**, 113 (1945). — MALORNY, G.: Verh. dtsch. Physiol. Ges. Mainz 1951. — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 619 (1952). — MOND, R., u. H. NETTER: Pflügers Arch. **224**, 702 (1930). — MOSERA, R.: Arch. Soc. Biol. Montevideo **14**, 76 (1947); **15**, 33 (1948). — NEUROTH, G., K. WEZLER u. G. SIEGLITZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 378 (1953). — ROTHSCHUH, K. E.: Elektrophysiologie des Herzens. Darmstadt 1952. — Pflügers Arch. **258**, 406 (1954). — VANREMOORTEERE, E., M. GOFFART u. Z. M. BACQ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 31 (1950).

Dr. H. F. BENTHE, Kiel, Pharmakologisches Institut d. Univ.

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. FR. LINNEWERH).

Beiträge zum Studium der Bewegungsformen glattemuskuliger Organpräparate*.

Von

UWE STAVE.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Juni 1954.)

In einer früheren Untersuchung über den Einfluß von Kohlensäure und Wasserstoffionenkonzentration auf glattemuskulige Organe (STAVE, 1953) konnte bezüglich des Ursprungs der Spontanbewegungen nach Befunden und Theorien aus der Literatur nur eine recht vorsichtige Formulierung gewählt werden, da sich aus den eigenen Befunden kein neuer Gesichtspunkt ergab. Das Blasenpräparat vom Meerschweinchen ließ auch im Hinblick auf seinen histologischen Aufbau keine anderen Ergebnisse als die am Darmpräparat gewonnenen erwarten.

Um die Jahrhundertwende lautete die Frage nach dem Ursprung der Automatie: Myogen oder ganglionär. Die von MAGNUS (1905) eingeführte Methodik zur Isolierung der Darmmuskelschichten und der nervösen Plexus fand einen gewissen Abschluß durch die Arbeiten von v. ESVELD (1928). Dieser Autor konnte den Nachweis erbringen, daß erstens die früher als ganglienfrei bezeichneten Ringmuskelpräparate noch einzelne, verstreut liegende Ganglienzellen enthalten können, zweitens die nach Serienschnitt-Untersuchungen ganglienfreien Präparate auch Automatie zeigen (vgl. auch GASSER, 1926) und drittens alle Präparate ein nervöses Syncytium aufweisen, das auch nach tagelanger Lagerung auf Eis histologisch unverändert darstellbar bleibt. So konnte zwar die Bedeutung der Ganglien geklärt werden, indem ihre Mitwirkung bei der Entstehung der Automatie als nicht unbedingt notwendig hingestellt wurde, aber die Frage blieb in der veränderten Formulierung bestehen: Ist die Automatie myogen oder nervös induziert. Durch die mehrfachen Beobachtungen an Embryonen, daß vor dem Auftreten nervöser Elemente am Herzen dieses bereits zu schlagen beginnt und durch die eindeutigen Befunde von BAUR (1928) an der Amnionmuskulatur von Huhn und Gans konnte letztlich nur bewiesen werden, daß embryonale, noch nicht in die Sonderaufgaben des höher differenzierten Organismus eingespannte glatte Muskulatur zu Spontan-tätigkeit befähigt ist. Die Automatie im höher differenzierten Organismus wurde weiter als von nervösen Elementen ausgehend angesehen. Diese Ansicht war weder durch histologische Untersuchungen noch durch pharmakologische Maßnahmen

* Diese Untersuchungen wurden am Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. med. E. KEESER) begonnen. Herrn Prof. Dr. K. SOEHRING bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

weiter zu unterbauen. Die präparative Trennung des nervösen Syncytiums von der Muskelfaser ist bis heute nicht möglich und wegen der engen Verflechtung auch kaum denkbar. Methoden, die zur Degeneration der Nerven führen, sind wiederholt angewandt worden und gaben interessante Aufschlüsse über Empfindlichkeitssteigerungen denervierter Präparate (CANNON u. ROSENBLUETH, 1949). MARTINI u. DACHA (1950) konnten durch Parallelversuche besonders deutlich zeigen, daß die durch Degeneration entnervten Darmabschnitte (Katze) um 1—2 Größenordnungen empfindlicher reagierten als die normal innervierten; ebenfalls beobachteten die Autoren an den entnervten Präparaten eine stärkere Spontanaktivität. Aber wie bereits v. ESVELD (1928 b) histologisch zeigen konnte, weist das terminale Syncytium auch nach 10-tägigem Aufbewahren bei Eisschranktemperatur keine Veränderungen auf. Die „pharmakologische Entnervung“ konnte allein auch nicht zur Aufklärung beitragen, da die gemeinsame Beeinflussung von Muskelzelle und Syncytium eine exakte Differenzierung der Wirkung nicht zuließ. Die Ergebnisse der Untersuchungen an einzelnen quergestreiften Muskelfasern mit motorischer oder sensibler Nervenendigung haben manches Licht in bisher unklare Verhältnisse gebracht (vgl. ECCLES et al., 1941; STEIMAN, 1943; KUFFLER, 1948; KATZ, 1950; FATT u. KATZ, 1951). Es ist jedoch unseres Wissens bisher nicht gelungen, eine glatte Muskelfaser zu präparieren, die spontane Bewegungen ausführt. Dieses Experiment würde alle Zweifel beseitigen, wartet aber doch auf seine Durchführung.

Alle Schlüsse, die aus Untersuchungen an isolierten Organpräparaten gezogen werden, können nach dem oben Gesagten für die Frage nach dem Ursprung der Automatie nur beschränkte Bedeutung haben. Schon früher führten Untersuchungen am isolierten Ureter zu der Schlußfolgerung einer myogenen Automatie und auch in jüngster Zeit wurde an solchen Präparaten diese Auffassung gewonnen (LULLIES, 1953). Es wurde von uns versucht, mit den zu Gebote stehenden Mitteln eine Versuchsanordnung auszuarbeiten, die besonders durch die in den letzten Jahren gewonnenen Kenntnisse über die Membranfunktionen am Muskel so ergänzt werden kann, daß sich viele wesentliche Befunde einordnen lassen.

Methodik.

Im Gegensatz zum Dünndarm haben Präparate vom Dickdarm nur sehr selten als Versuchsobjekte Verwendung gefunden, da ihre geringere Empfindlichkeit gegenüber Pharmaka sie den Dünndarmpräparaten unterlegen erscheinen lassen mußte (CATEL u. GRAEVENITZ, 1925, und BRAUNE, 1934). Die Histologie lehrt, daß die Tänien Längsmuskelbündel sind, die durch eine dünne Bindegewebsschicht von der Ringmuskulatur des Dickdarmes getrennt sind; im Bereich dieses trennenden Bindegewebes, d. h. auch noch in der Randzone der Muskulatur, liegen Ganglienzellen, so daß diese bei der Abtrennung der Tänien von der Ringmuskulatur zum größten Teil am isolierten Präparat verbleiben. Die am Coecum des Meerschweinchens stark ausgebildeten Tänien (*Taenia intestini crassi*) wurden von uns als Versuchsobjekte ausgewählt. Eine topographische Beschreibung der Meerschweinchentänien gab VAU (1934).

Während dieses Präparat für pharmakologische Auswertungen bisher keine Verwendung gefunden zu haben scheint, wurden mir nach Abschluß dieser Arbeit Untersuchungen von BÜLBRING u. HOOTON (1953) über Aktionspotentialmessungen und von BÜLBRING (1953) über Sauerstoffsverbrauchsbestimmungen an der Meer-schweinchentänie bekannt.

Zur *Versuchstechnik*. Nach Tötung des Meerschweinchens durch Genickschlag und Eröffnung der Bauchhöhle wurden am ventralen und dorsalen Coecum die freien Tänien mit der Pinzette leicht angehoben und mit der Schere so vom Darm getrennt, daß das Lumen nicht eröffnet wurde. Die Verwendung etwa 20 mm langer Präparate hat sich am besten bewährt; es konnten gut 6 Präparate von einem Tier gewonnen werden. An beiden Enden der Tänien wurde ein Seidenfaden befestigt, unten eine Schlinge und oben der Suspensionsfaden. Diese Präparate wurden im 10 cm³-Badgefäß bei 39° in Tyrodelösung aufgehängt. Im weiteren entsprach die Technik der früher dargestellten Methodik (STAVE, 1953). Bei einer Belastung von 1 g wurde mit einer Vergrößerung von 1:6 (Stirnschreibhebel) auf einem Rußkymographen registriert.

Alle Präparate, die unmittelbar nach der Präparation eingespannt wurden, zeigten sehr starke Tonusschwankungen und dementsprechend nur schlecht verwertbare Ergebnisse. Auch die Reizeffekte an den beiden ersten Versuchstagen waren deutlich schwächer als später. Um diesem Nachteil abzuhelpen, ist es seit langem üblich, Darmpräparate für einige Zeit bei Eisschranktemperatur zu verwahren. So wurden nur wenige Tänienpräparate zu Vergleichszwecken unmittelbar nach der Präparation in Versuch genommen, alle übrigen für 24 Std auf Eis gelegt. Aber auch die bereits über Stunden im Versuch gewesenen Präparate wurden wieder (in glucosefreier Säugetier-RINGER-Lösung) in den Eisschrank verbracht. Am zweiten Versuchstag erwiesen sich die Präparate bereits als wesentlich tonusbeständiger, und wenn auf gleiche Weise am dritten und an den weiteren Versuchstagen verfahren wurde, konnte ein über 12 Std konstanter Tonus und gleichbleibende Empfindlichkeit gegenüber Muskelstimulantien erzielt werden. So konnten einzelne Präparate über 250 Std reaktionsfähig gehalten werden, während sich die Zeiten im Badgefäß mit pharmakologischen Untersuchungen auf 50 Std und mehr summierten. Es konnte beliebig ein versuchsfreier Tag eingeschoben werden; auch wurden Präparate ohne Nachteil erst am 2. oder 3. Tag in Versuch genommen. Erstmals nach 5 Tagen eingespannte Präparate reagierten nicht mehr. Alle Präparate wurden nach dem Versuch unmittelbar in die eisgekühlte RINGER-Lösung verbracht und ebenso zum Einspannen sofort aus der kalten RINGER-Lösung in das Tyrodebad von 39° gehängt. Die Reaktionsfähigkeit der Präparate wurde routinemäßig mit Acetylcholin (ACh), Histamin (Hist.) und BaCl₂ sowie einer Reihe von Hemmsubstanzen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen geprüft (Atropin, Papaverin, Curare und mehrere ähnlich wirkende Verbindungen). Alle Pharmaka wurden in 1 cm³ Tyrodelösung verdünnt dem Bad zugefügt. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Bad (g/cm³).

Ergebnisse.

Die nach der Eisschranklagerung eingespannten Präparate reagierten zunächst nicht auf ACh und Hist. und zeigten keine Spontanbewegungen. Bis zum Auftreten der Reaktionen an den ersten Versuchstagen vergingen 30—60 min, später bis zu 2 Std. Bevor die Automatie einsetzte, konnte eine zunehmende Empfindlichkeit gegen Hist. und ACh registriert werden, das Hist. führte deutlich früher zu Effekten als das

ACh. Dieses wurde bei alternierender Gabe von Hist. und ACh in maximalen Reizdosen besonders deutlich (Abb. 1 A und B). Erst nach Erreichen der maximalen Kontraktionshöhe auf Hist.- und ACh-Gaben trat nach weiteren 30—60 min die Automatie mit kleinen, langsam an Höhe zunehmenden Kontraktionen in Erscheinung.

Die Spontanaktivität der Tänienpräparate äußerte sich in 2 deutlich voneinander trennbaren Typen, die allein oder selten auch gemischt auftraten; meist blieben sie über einen Versuchstag konstant. Typ I

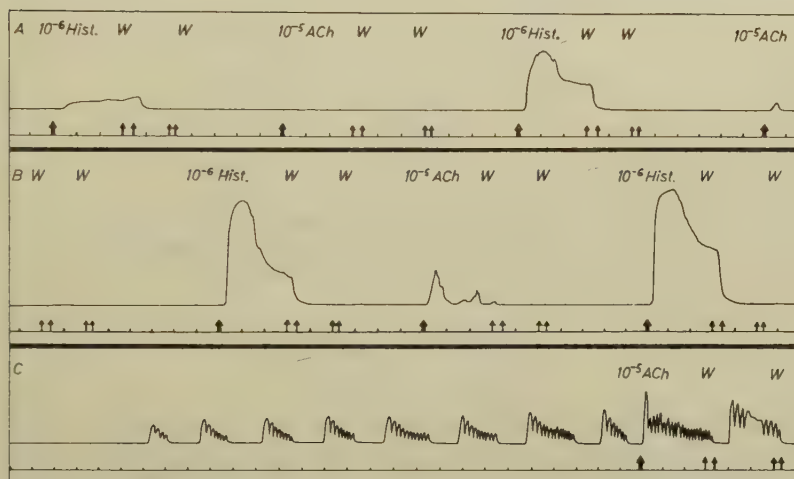


Abb. 1. A und B ist fortlaufende Kurve. Erste Reaktionen auf ACh und Hist. am 3. Versuchstag. W = Waschung mit Durchlaufmethode. C Beginn einer Automatie vom Typ II und ACh-Reaktion dabei. (4. Versuchstag.) Zeitmarkierung = min.

war durch regelmäßige Kontraktionen und Erschlaffungen gekennzeichnet, die mit Ausnahme gelegentlicher Deformitäten im Ablauf der Kontraktion immer durch Strecken einer Grundspannung voneinander getrennt waren. Nur selten kam ein „echter Rhythmus“ zur Beobachtung, meist dann nur kurzfristig (z. B. Abb. 3). Der zweite Typ war durch Gruppenbildung gekennzeichnet; die Kontraktionsabläufe dieser Gruppen waren einander äußerst ähnlich und höchstens im zeitlichen Ablauf verschieden; die Gruppen waren ebenfalls durch Strecken einer Grundspannung voneinander getrennt (Abb. 1 C). Die Höhe der Spontanbewegung war nicht von der Überlebenszeit direkt abhängig, mit Ausnahme des letzten Versuchstages, an dem die Automatie zusammen mit der Ansprechbarkeit gegen Pharmaka erlosch, letztere jedoch noch bis zu einigen Stunden länger nachweisbar blieb (vgl. Abb. 5 A—E).

Vergleicht man den Kontraktionsablauf von ACh und Hist. bei Präparaten mit verschiedenen Automatietypen, fällt oft eine Abhängig-

keit der provozierten Kontraktion von der spontanen auf. In Abb. 1C begann eine Spontanaktivität vom Typ II, die durch ACh nachgeahmt

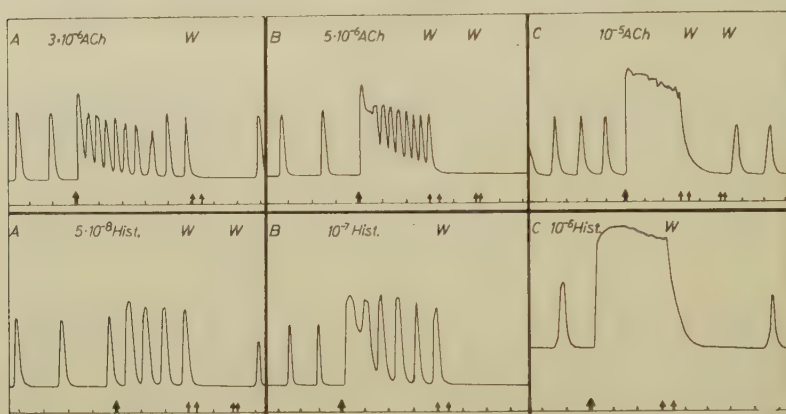


Abb. 2. ACh und Hist. in steigenden Dosen. Übergang von provozierten Kontraktionen, die die spontanen Kontraktionen nachahmen, zur Kontraktur (5. Versuchstag).

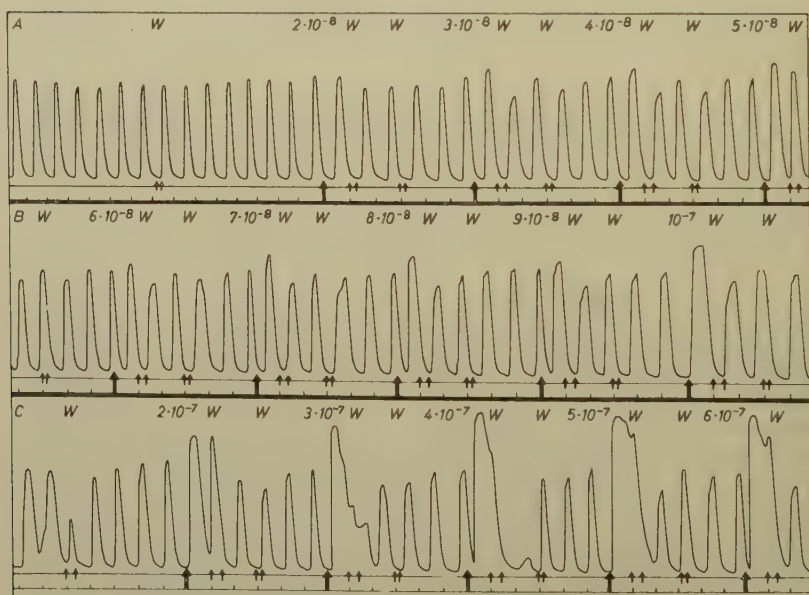


Abb. 3. A, B und C ist fortlaufende Kurve. Beeinflussung der Automatie (Typ I) durch steigende Hist.-Dosen (4. Versuchstag).

wurde. Dieses Nachahmen war konzentrationsabhängig; während die Schwellenkonzentration und submaximale Dosen dieses deutlich zeigten,

wurde bei Verwendung maximaler Dosen dieser Effekt durch den tetanischen Charakter der Kontraktionen überdeckt (Abb. 2). An einem Präparat mit besonders stark ausgeprägter Automatie vom Typ I wurde durch steigende Dosen Hist. der „Rhythmus“ der Automatie allmählich durchbrochen (ab 10^{-7}), bzw. die niedrigen Hist.-Konzentrationen (bis $9 \cdot 10^{-8}$) verstärkten nur die planmäßig erwartete Kontraktion (Abb. 3).

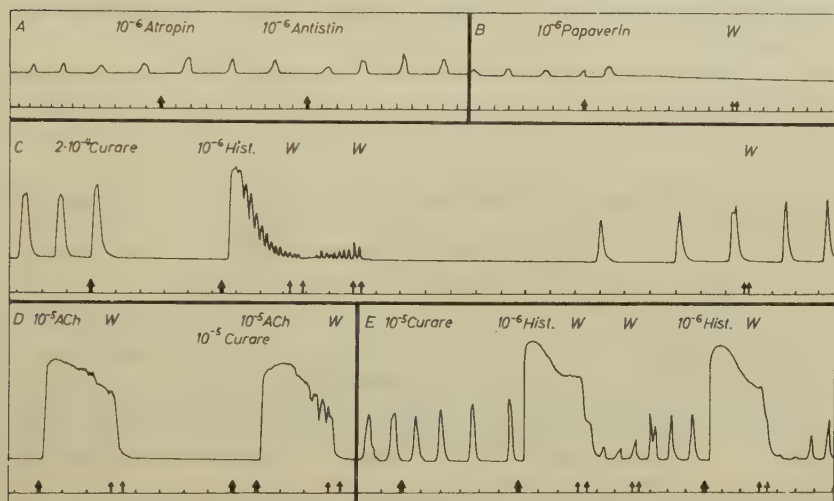


Abb. 4. *A* Atropin und „Antistin“ lähmen Automatie nicht, während (*B*) Papaverin die Spontanaktivität unterdrückt (8. Versuchstag). *C* Curare in stärkerer Dosierung lähmt die Spontanaktivität, nicht dagegen die Hist.-Empfindlichkeit (4. Versuchstag).

Der Einfluß der Hemmsubstanzen auf die Automatie ergab folgende Befunde: Atropin und Antihistaminica beeinflussten die Automatie nicht oder ließen in den ersten Versuchstagen eine geringe Verstärkung erkennen (Abb. 4A). Papaverin lähmte nach einigen Minuten die Spontanbewegungen; dieser Effekt war erst nach 20—30 min reversibel (Abb. 4B). Curare beeinflusste in Dosen, die am Nerv-Muskelpreparat eine komplette Überleitungshemmung bewirkten (10^{-6}) die Automatie gar nicht. Konzentrationen von 10^{-5} verstärkten die Automatie in geringem Maße (Abb. 4E). Als besonderer Befund wurde bei lang andauernder Einwirkung von Curare die Umwandlung vom Bewegungstyp I in Typ II beobachtet (Abb. 5F). Die Applikation höherer Dosen Curare (10^{-4} und $2 \cdot 10^{-4}$) bewirkte Lähmung der Spontanaktivität, nicht dagegen die Ansprechbarkeit gegenüber Hist. oder ACh (Abb. 4C und D); in einzelnen Fällen konnte wiederum (STAVE, 1953) in den ersten Versuchstagen eine geringe Steigerung der Kontraktionshöhen unter Curarewirkung beobachtet

werden (Abb. 6A). BaCl_2 in unterschwelligen Dosen bewirkte eine synergistische Steigerung der ACh- und Hist.-Kontraktionen (Abb. 6B und C).

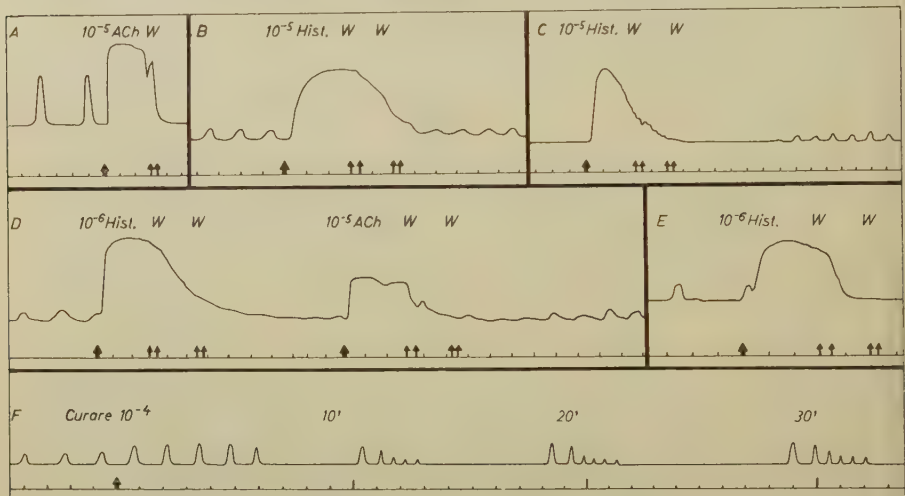


Abb. 5. *A* ACh-Kontraktion am 5. Versuchstag. *B* Hist.-Kontraktion am 6. Versuchstag. *C* Hist.-Kontraktion am 9. Versuchstag. *D* Hist.- und ACh-Kontraktion am 10. Versuchstag. *E* Hist.-Kontraktion am 10. Versuchstag. Alle Kurven sind von verschiedenen Präparaten, die weiterhin, wegen der abfallenden Empfindlichkeit, nicht mehr verwendet wurden. *F* Curare bewirkt Übergang von Automatie-Typ I in Typ II.

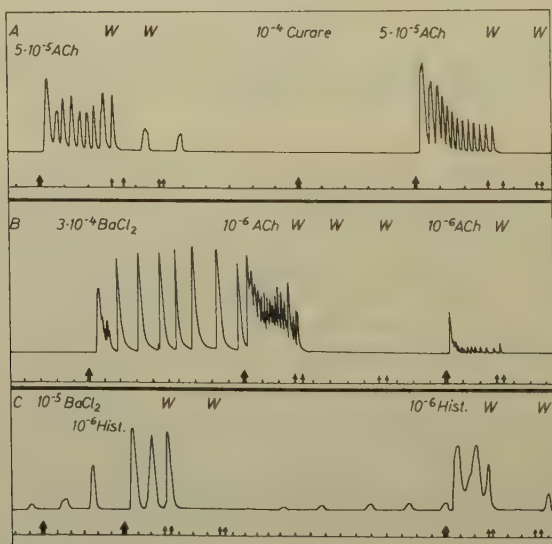


Abb. 6. *A* Curare verstärkt ACh-Kontraktur in geringem Maße. (4. Versuchstag.) *B* BaCl_2 löst Automatie aus und verstärkt ACh-Kontraktion (5. Versuchstag). *C* BaCl_2 verstärkt Automatie und Hist.-Kontraktion (8. Versuchstag).

Besprechung der Ergebnisse.

Die Vorbehandlung von Darmpräparaten durch Lagerung im Kühlschrank ist schon lange Zeit üblich und von mehreren Autoren näher untersucht worden (GUNN u. UNDERHILL, 1914; ALVAREZ u. MAHONEY, 1922; GASSER, 1926; v. ESVELD, 1928; MARTINI u. DACHA, 1950, u. a.). Bei seinem Nachweis, daß bei Eisschranktemperaturen neben einzelnen Ganglienzellen das nervöse Terminalreticulum bis zu 10 Tagen histologisch keine Veränderungen zeigt, hat v. ESVELD die Darmpräparate in sauerstoffgesättigtem Pferdeserum verwahrt. In unseren Versuchen mit reiner Salzlösung fällt auf, daß an den ersten beiden Versuchstagen die Präparate einen inkonstanten *Tonus* aufweisen; dies entspricht den üblichen Befunden an frischen Darmpräparaten. Am dritten Versuchstag stellte sich bald nach dem Einhängen in das Bad eine konstante Grundspannung als Ausdruck einer Ruhelage ein.

Der Begriff des Tonus der glatten Muskulatur umfaßt mehrere Komponenten, wobei neben der vegetativen Erregungslage auch der Zustand des Bindegewebes von Bedeutung ist. Frische Darmpräparate demonstrieren das eine durch ihr Verhalten gegenüber sympathico- und parasympathicotropen Stoffen, das andere durch ihre Reaktionsweise gegenüber Säuren und Alkalien (WÖHLISCH u. DU MESNIL, 1928; WEISS, 1929; siehe auch STAVE, 1953). Wenn Atropin in einer Dosierung, die ACh-Kontraktionen sicher verhindert, an einem Tänienpräparat mit konstanter Grundspannung keine Effekte zeigt, könnte dieses durch den Ausfall der nervösen Steuerung bedingt sein. Schon HENDERSON (1922) sprach dem Atropin jeden Einfluß auf die contractile Substanz ab, und neuere Untersuchungen an isolierten Actomyosinfäden bestätigten diese Auffassung (MCINTRE u. BRAVERMAN, 1947).

In unseren Versuchen gelang es mit keinem Pharmakon, die Grundspannung des Tänienpräparates weiter herabzusetzen. Auch nach Erlöschen jeder Reaktionsfähigkeit blieb die Grundspannung unverändert (vgl. dazu die Untersuchungen von MORITA, 1924, und MANGOLD u. SCHUSTER, 1953, über die fehlende Totenstarre und den stark protrahiert verlaufenden Absterbeprozess am glatten Muskel). Während man an den ersten beiden Versuchstagen mit Recht von einem „Tonus“ der Tänienpräparate sprechen kann, muß das absolut passive Verhalten im späteren Versuchsverlauf als „*Spannungslage*“ bezeichnet werden. Nur durch Änderung der Belastung der Präparate wird diese Grundspannung variiert, ohne aber einen prinzipiellen Wechsel der Reaktionsformen zu bewirken. Sollte es gerechtfertigt sein, einen contractilen, automatischen und tonischen Mechanismus am glatten Muskel zu trennen, muß hier vom Ausfall der tonischen Funktion gesprochen werden. Das aber würde den Ausfall der nervösen Regulation bedeuten. Während Atropin und Curare in einer am tonischen Präparat wirksamen Dosierung später weder Spannungslage noch Automatie beeinflussen, lähmt Papaverin, dem immer eine unmittelbar myotrope Wirkung zugeschrieben wird, auch die Spontanaktivität an älteren Tänienpräparaten. — Es muß hier noch

erwähnt werden, daß die Empfindlichkeit gegen ACh und Hist. an Präparaten mit konstanter Grundspannung größer als an den Präparaten mit inkonstantem Tonus (zu Versuchsbeginn) war.

Die Abhängigkeit der Effekte sehr kleiner Histamindosen von der Spontanaktivität erhellt aus Abb. 3. Man gewinnt den Eindruck, daß kleine Hist.-Dosen lediglich verstärkend auf die planmäßig ablaufenden Spontankontraktionen einwirken. Erst stärkere Hist.-Reize durchbrechen den „Rhythmus“ der Automatie, bis schließlich die maximalen Reizdosen zum Kontraktionszustand, der Kontraktur, führen. Diese in vielen Variationen beobachtete Gesetzmäßigkeit legt es nahe, die spontane und die provozierte Kontraktion in ihrem Mechanismus zu identifizieren und nur noch die auslösenden Faktoren zu trennen. Dieses muß dann auch bei der Unterscheidung von contractilem, automatischem und tonischem Mechanismus insofern gelten, als nur die eine Kontraktion auslösenden Momente differenziert werden können.

Unter Zugrundelegung der im letzten Jahrzehnt gewonnenen Erkenntnisse über die Zusammenhänge elektrischer Vorgänge und Permeabilität an der Muskelmembran muß dem Einfluß der Pharmaka auf die Membranladungsverhältnisse größte Beachtung gezollt werden. Während die Stabilisierung des Membranpotentials durch Curare seit den Untersuchungen von ECCLES, KATZ u. KUFFLER (1941) als gesichert gilt, konnte erst in neuerer Zeit die Wirkung des ACh an der Zellmembran weiter aufgeklärt werden (vgl. BARNES u. BEUTNER, 1949). Es muß nach Befunden von FATT (1950) der ACh-Effekt als Änderung der Membranpermeabilität aufgefaßt werden, die mit Depolarisation einhergeht. Unterschwellige ACh-Dosen führen zu einer geringen Depolarisation, die keine ausreichende Permeabilitätsänderung bewirkt und keine Kontraktur auslöst. Zusätzliche Einwirkung anderer depolarisierender Stoffe könnte die durch ACh begonnene Depolarisation kompletieren und den Ablauf der Kontraktion herbeiführen. Der Synergismus von BaCl_2 und ACh (oder Hist.) wäre auf diesem Wege ebenso verständlich wie die Wirkung unterschwelliger Dosen verschiedener Muskelstimulantien auf die Automatie (vgl. KUSCHINSKY u. LÜLLMANN, 1950; KLINGE, 1951; PICK, HOLLINCK u. ZACHARELLIS, 1953). Bezüglich der Automatie setzt dieses aber voraus, daß das Membranpotential von irgendeinem Prozeß her zu gewissen Zeiten in verschiedenem Maße negativiert würde. Diese Negativierung kann entweder zur vollständigen Depolarisation führen und die spontane Kontraktion auslösen oder unterschwellig bleiben. Das nach einer provozierten Kontraktion zu beobachtende temporäre Ausbleiben der Automatie kann auf dem Energiebedarf des assimilatorisch arbeitenden Zellstoffwechsels zur Auffüllung der verbrauchten Kontraktionsenergie beruhen. BEZNAK (1952) konnte am Kaninchen-Dünndarmpräparat demonstrieren, daß das Wiedereinsetzen der Automatie nach einer provozierten Kontraktur von der Reizdosis abhängig ist. Diese Beobachtungen lassen den Vorgang der Impulsbildung für die Automatie eher in der Zelle, und zwar im Zellstoffwechsel vermuten, als extracellulär in nervösen Elementen. Wenn es gelingt, im Zellstoffwechsel Vorgänge aufzudecken, die einen gewissen Rhythmus aufweisen, und wenn es gelingt, parallel dazu Membranpotentialschwankungen bzw. Permeabilitätsänderungen aufzuzeichnen, würde diese Anschauung an Wahrscheinlichkeit gewinnen. Ein Schritt in dieser Richtung ist bereits getan, denn BÜLBRING u. HOOTON (1953) ist es gelungen, mit der intracellulären Mikroelektrode an der Meerschweinchenintestine Potentialschwankungen zu registrieren, die den Spontanbewegungen zugeordnet werden müssen.

Die Hemmung der Automatie unter der Einwirkung hoher Dosen Curare muß ein Effekt der Membranstabilisierung sein. Die nach größeren Curaregaben abnehmende Kontraktionshöhe der Automatie und das Seltenerwerden der einzelnen Kontraktionen lassen sich dann durch die zunehmende Membranpotentialstabilisierung erklären. Die Umwandlung des Bewegungstyps I in Typ II dürfte ebenfalls darin ihre Ursache haben. Die bereits von FELDBERG (1951) beschriebene Verstärkung einer Hist.- und ACh-Kontraktion durch kleine Curaredosen konnte nur an einzelnen Präparaten (meist nicht an älteren) wiederum bestätigt werden (STAVE, 1953; SOEHRING, 1953), ohne daß bisher eine befriedigende Erklärung möglich ist. Es liegen aber in der Literatur Befunde vor, die auf eine frühere, dosisabhängige Depolarisationshemmung der Nervenendigungsbereiche (Endplattenregion) gegenüber der übrigen Muskelzelloberfläche hinweisen, so daß kleine Curaredosen bereits diese Bezirke beeinflussen, nicht aber die gesamte Muskelzellmembran.

Die nach jedem erneuten Einspannen der Tänienpräparate beobachtete Latenzphase endet nicht plötzlich, sondern geht in ein Stadium langsam einsetzender Ansprechbarkeit über. Die ersten, noch sehr geringen, fast tonisch wirkenden Effekte von Hist. und ACh im Vergleich zu den später rasch einsetzenden Kontraktionen erinnern an die Befunde von RÖSSEL (1951) und BRECHT (1952). Diese Autoren konnten durch Entfernung des Bindegewebes die tonischen Reaktionen des M. rectus abd. vom Frosch umwandeln in solche mit schneller Initialkontraktion, wie sie z. B. dem Sartorius eigen sind. Das Bindegewebe erschwert also der Aktionssubstanz den Zugang zu den Muskelfasern. Da die Tänienpräparate mit zunehmendem Alter eine längere Latenzperiode nach dem Einbringen in das Badgefäß zeigen, muß eine Abdichtung der Bindegewebshüllen die Ursache dieser Erscheinung sein. Das Hist. führt deutlich früher zu Effekten als das ACh, es zeigt eine größere Penetrationsfähigkeit, was ja durchaus dem Unterschied zwischen primärer bis tertiärer und quaternärer Base entspricht. Die verlängerte Diffusionszeit durch das Bindegewebe mit verringerter Permeabilität bewirkt, daß das ACh den Gewebsesterasen länger ausgesetzt und dadurch teilweise abgebaut wird (eine Möglichkeit, die auch BRECHT, 1952, diskutiert). Hist. ist dem fermentativen Abbau schwerer zugänglich. Hinzu kommt der Effekt des Einschleichens durch die Siebwirkung der Bindegewebshülle, so daß letztlich die langsame, vergleichsweise als tonisch zu bezeichnende Reaktion resultiert.

Wenn man rückblickend alle Beobachtungen zusammenfaßt, muß man den Eindruck gewinnen, daß die Spontanaktivität der Tänie nach längerer Versuchsdauer (Tagen) *myogen* induziert ist. Die sicher der embryonalen Muskelzelle eigene Spontanmotilität scheint unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wieder zutage zu treten. Es muß

angenommen werden, daß der Absterbeprozess sehr protahiert verläuft und gewissermaßen rückläufig Stufen des embryonalen Entwicklungsprozesses wiedererscheinen. Beweise dafür, daß die nervösen Elemente früher als die Muskelzellen absterben, konnten nicht erbracht werden, jedoch weisen die Ergebnisse stark in diese Richtung.

Während im intakten Organismus die Motilität der glatten Muskulatur sicher nervös gesteuert ist, muß die Frage offen bleiben, ob gelegentlich myogene Impulse modulierend in die Bewegungsabläufe eingreifen, ohne wesentliche Bedeutung zu erlangen.

CATEL (1936) kommt in seiner Monographie über die „Bewegungsvorgänge im gesamten Verdauungskanal“ zu dem Schluß, daß es „durchaus denkbar“ wäre, „daß die ursprünglich der glatten Muskulatur zukommende Eigenschaft der Automatie später mit fortschreitender anatomischer Entwicklung und funktioneller Differenzierung des Organismus immer vollständiger vom Nervensystem übernommen würde“. Diese Auffassung entspricht auch der neuerdings von BETHE (1952) ausgesprochenen Formulierung, daß die Automatie eine Grundeigenschaft der lebenden Substanz ist und der Rhythmus auf Stoffwechselvorgänge hinweist. Wenn die Auslegung der hier dargestellten Untersuchungen in diesem Sinne geschieht, möge es ein Beitrag sein, die Mechanik der glatten Muskulatur weiter zu klären.

Zusammenfassung.

Meerschweinchen-Tänienpräparate wurden bei alternierender Behandlung durch Eisschränklagerung und Untersuchungen im 39°-Tyrodebad bis zu 11 Tagen überlebend gehalten. Während sich die Tänienpräparate an den ersten beiden Versuchstagen in ihrem Verhalten kaum von Dünndarmpräparaten unterschieden, stellte sich ab 3. Versuchstag ein Zustand ein, der dem Studium der Bewegungsformen besonders dienlich war. Die an den ersten Versuchstagen alle pharmakologischen Untersuchungen erschwerenden Tonusschwankungen und unberechenbaren Spontanbewegungen wurden später abgelöst durch eine konstante Grundspannung und eine Automatie, die oft an „echten Rhythmus“ erinnerte. Es konnten 2 Bewegungstypen der Automatie unterschieden werden. Die Empfindlichkeit gegen Erregungsmittel wurde ab 3. Versuchstag nur wenig geringer als an frischen Dünndarmpräparaten gefunden. Aus dem Verhalten gegenüber Hemmungssubstanzen konnten Rückschlüsse auf den Mechanismus der Spontankontraktion gewonnen werden. Eine Unterscheidung von contractilem, tonischem und automatischem Mechanismus erscheint nur in bezug auf die auslösenden Faktoren gerechtfertigt. Die heutigen Kenntnisse der physikochemischen Vorgänge an der Muskelzellgrenzfläche werden zur Erklärung der Befunde herangezogen. Es wird die Frage diskutiert, ob die sicher der embryonalen Muskelfaser eigene myogene Automatie an der lange überlebenden Tänie nach Ausfall der nervösen Steuerung wieder zutage tritt.

Literatur.

- ALVAREZ, W. C., and L. J. MAHONEY: Amer. J. Physiol. **59**, 421 (1922). — BARNES, T. C., and R. BEUTNER: Nature (Lond.) **164**, 109 (1949). — BAUR, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **134**, 49 (1928). — BETHE, A.: Allgemeine Physiologie, Berlin 1952. — BEZNAK, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 237 (1952). — BOGATZKI, M.: Z. exper. Med. **118**, 544 (1952). — BRAUNE, B.: Jb. Kinderheilk. **144**, 164 (1934). — BRECHT, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **214**, 292 (1952). — BÜLBRING, E.: J. of Physiol. **122**, 111 (1953). — BÜLBRING, E., and I. N. Hooton: J. of Physiol. **120**, 8 P (1953). — CATEL, W.: Bewegungsvorgänge im gesamten Verdauungskanal. Leipzig 1936. — CATEL, W., u. F. v. GRAEVENITZ: Jb. Kinderheilk. **109**, 249 (1925). — CANNON, W. B., and A. ROSENBLUTH: The supersensitivity of denervated structures. New York 1949. — EVELD, L. W. v.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **134**, 347 (1928, a). — Z. mikrosk.-anat. Forsch. **15**, 1 (1928, b). — ECCLES, J. L., B. KATZ and S. W. KUFFLER: J. of Neurophysiol. **4**, 362 (1941). — FATT, P.: J. of Physiol. **111**, 408 (1950). — FATT, P., and B. KATZ: J. of Physiol. **115**, 320 (1951). — FELDBERG, W.: J. of Physiol. **113**, 483 (1951). — GASSER, H. S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **26**, 395 (1926). — GUNN and UNDERHILL: Quart. J. Exper. Physiol. **8**, 275 (1914). — HENDERSON, V. E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **27**, 205 (1922). — KATZ, B.: J. of Physiol. **111**, 261 (1950). — KLINGE, F. W.: Amer. J. Physiol. **164**, 284 (1951). — KUFFLER, S. W.: Federat. Proc. **7**, 437 (1948). — KUSCHINSKY, G., u. H. LÜLLMANN: Klin. Wschr. **1950**, 137. — LULLIES, H.: Diskussionsbem. auf der 20. Tagung Dtsch. Ges. Physiol. 1953. Ber. ges. Phys. **162**, 342 (1954). — MAGNUS, R.: Pflügers Arch. **108**, 1 (1905). — MANGOLD, E., u. E. SCHUSTER: Die Totenstarre der Darmmuskulatur. Berlin 1953. — MARTINI, V., u. U. DACHA: Boll. Soc. ital. Biol. sper. **26**, 1123 (1950). — McINTREY, A. R., and J. BRAVERMAN: Federat. Proc. **6**, 158 (1947). — MORITA, G.: Pflügers Arch. **205**, 108 (1924). — PICK, F. P., H. L. HOLLINCK u. G. ZACHARELLIS: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 83 (1953). — RÖSSEL, W.: Pflügers Arch. **253**, 224 (1951). — SOEHRING, K.: Ref. Dtsch. Physiol. Ges., Bad Homburg, 1953. Ber. ges. Physiol. **162**, 342 (1953). — STAVE, U.: Arzneimittel.Forsch. **3**, 506 (1953). — STEIMAN, S. E.: Amer. J. Physiol. **140**, 269 (1943). — VAU, E.: Anat. Anz. **79**, 138 (1934). — WEISS, P.: Z. vergl. Physiol. **9**, 665 (1929). — WÖHLISCH, E., u. R. DU MESNIL DE ROCHEMONT: Z. Biol. **87**, 364 (1928).

Dr. UWE STAVE, Marburg/Lahn, Univ.-Kinderklinik.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West.

Das Schicksal von 17- α -Oxyprogesteron im menschlichen Organismus.

Von

H. LANGECKER und W. PRESCHER*.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 9. Juni 1954.)

Von PFIFFNER und NORTH (1) sowie von v. EUW und REICHSTEIN wurde im Jahre 1941 aus der Nebenniere von Schlachttieren 17- β -Oxyprogesteron (nach der heute fast allgemein angenommenen Nomenklatur von FIESER als α bezeichnet) dargestellt. Nach neueren Untersuchungen nimmt Progesteron, das offenbar aus Acetat oder Cholesterin im Organismus entstehen kann, in der Biosynthese der Coritcosteroide eine Schlüsselstellung ein. Es kann zu 17- α -Oxyprogesteron (I) umgewandelt und über Compound S zu Compound F und E oxydiert werden (LIEBERMANN). Nach Verabreichung von Compound F treten im Harn 21-Desoxy-Metabolite auf, die I nahestehen.

Während I praktisch keine progestionale Wirkung zeigt [PFIFFNER und NORTH (2)], haben Versuche von JUNKMANN (siehe die vorangehende Arbeit) überraschenderweise ergeben, daß 17-Ester von I wirksam sind. Aus diesem Grund schienen Untersuchungen über das Schicksal von I und seinen 17-Estern im Organismus von Interesse.

Nach FUKUSHIMA wird die Seitenkette des I partiell unter Entstehung von Metaboliten abgebaut, ähnlich denen, die beim Testosteron-Abbau auftreten. PFIFFNER sowie v. EUW nehmen in Analogie zu Progesteron-Pregnandiol an, daß I eine Vorstufe von Pregnantriol ist. BONGIOVANNI (1) konnte jedoch nach i.v. Verabreichung von 7 mg I bzw. i.m. von 25 mg bei männlichen Vpn. keine Vermehrung der Pregnantriolausscheidung im Harn nachweisen, was mit Rücksicht auf die kleinen Dosen die Annahme von PFIFFNER bzw. von v. EUW nicht widerlegt. Nach BONGIOVANNI (2) tritt im Harn von Kranken mit adrenogenitalem Syndrom vermehrt 3 α , 17 α , 20 α -Pregnantriol auf, das unter Cortison zurückgeht. JAILER (1) nimmt an, daß bei diesem Syndrom im Verlauf der Corticosteroidsynthese die Umwandlung von 17 α -Oxyprogesteron zu Compound F blockiert ist. Damit würde das vermehrte Auftreten von Pregnantriol gut übereinstimmen, das doch vermutlich einen Metaboliten vom 17 α -Oxyprogesteron darstellt. BONGIOVANNI konnte bei diesen Kranken nach 17- α -Oxyprogesteron (25—100 mg i.m.) Pregnantriol nachweisen, nicht aber bei normalen Individuen. BURSTEIN hat bei 2 weiblichen Kranken mit rheumatischer Arthritis nach Verabreichung von 1 g bzw. 3 g 21-Desoxycortison im Harn kein unverändertes 21-Desoxycortison nachweisen können und als

* Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von dem einen von uns (P.) als Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin 1954 vorgelegt.

Metabolite folgende Steroide isoliert: Pregnan-3 α , 17 α -diol-11,20-dion, Etiocholan-3 α , 11 β -diol-17-one, $\Delta^9(11)$ -Etiocholan-3 α -ol-17-one, 11 β -Hydroxyandrosterone, $\Delta^9(11)$ -Androsten-3 α -ol-17-one, Etiocholan-3 α -ol-11,17-dione, Etiocholan-3 α -ol-17-one. Die Gesamtausbeute betrug jedoch nur etwa 1% der verabreichten Menge.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Klarstellung des Schicksals der Seitenkette von I an einer gesunden männlichen Person nach intramuskulärer Verabreichung von I (0,5 bzw. 1,0 g) und seinem 17-Capronat (250 mg) im Harn die Ausscheidung von 17-Ketosteroiden, Pregnandioli, Pregnantrioli, I, Corticoiden und Cortison verfolgt.

Die verwendeten Substanzen wurden im Hauptlaboratorium in der Abteilung des Herrn Dr. SCHENK von Herrn Dr. KASPAR hergestellt. I = $C_{21}H_{30}O_3$ Mol.Gew. 330,45 F.P. 112—115°/M_D / = + 265,6° (CHCl₃). 17- α -Oxyprogesteron-17-capronat, $C_{27}H_{40}O_4$, Mol.Gew. 428,5, farblose Kristallnadeln F.P. 119/120—21°.

Methodik.

Die Bestimmungen wurden in einem aliquoten Teil eines Tagesmischharnes durchgeführt, und zwar die der 17-Ketosteroide in einer bei LANGECKER (1) beschriebenen Modifikation. Für die Bestimmung des Pregnandiols hat sich unter Nachprüfung der Methode von DIBBELT, TALBOT und GOLDFINE folgender Vorgang bewährt:

Reagentien. Konz. Salzsäure p.A., Toluol (gewaschen mit 10%ig. Sodalösung und Wasser, destilliert), abs. Alkohol p.A., Aceton, Natronlauge 1 n, Natronlauge n/10 n, Petroläther, konz. Schwefelsäure p.A. Alle Glassachen wurden vorher mit abs. Alkohol vorgewaschen.

100—500 cm³ Harn werden mit $\frac{1}{10}$ des Volumens konz. Salzsäure unter Rückfluß 10 min gekocht und rasch abgekühlt, zweimal mit dem halben Volumen Toluol ausgeschüttelt. Der Toluolextrakt wird zweimal mit 1 n Natronlauge ($\frac{1}{10}$ des Volumens) und einmal mit der gleichen Menge Wasser gewaschen, anschließend bei 22° Innentemperatur im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 15—20 cm³ heißem Alkohol gelöst und durch ein Kohlefilter (Schleicher und Schüll Nr. 508) in ein Zentrifugenglas filtriert. Das Filtrat wird unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Der in 5 cm³ Aceton gelöste Rückstand wird mit 20 cm³ heißer $\frac{1}{10}$ n NaOH langsam unter Schütteln gefällt, für 2 Std bei 37° und über Nacht im Eisraum stehengelassen. Der Niederschlag wird zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Glas mit dem Niederschlag umgekehrt auf einem Filterpapier abgesaugt. Der Niederschlag wird mit 1 cm³ 25%igem Alkohol gewaschen und in 20 cm³ abs. Alkohol gelöst. Aliquote Teile werden eingedampft, mit Petroläther gewaschen und der Rückstand mit 5 cm³ konz. Schwefelsäure versetzt. Die Farbmessung erfolgt nach 30 min im HAVEMANN-Colorimeter in einer 5 cm³-Cuvette mit Filter BG 12. Die Werte wurden in Beziehung gebracht zu einer Schwefelsäurereaktion von 100—500 γ 3 α -20 α -Pregnandioli.

Pregnantrioli wurde nach LANGECKER (1) bestimmt. Für die Bestimmung des I im Harn wurde die Reduktion zu Pregnantrioli benutzt, die nach einem Vorschlag von WITZEL mit Natriumborhydrid ausgeführt wurde. Man muß dazu von der mit Girard T-Reagens abgeschiedenen Ketonfraktion ausgehen, womit gleichzeitig eine Abtrennung des vorgebildeten Triols erreicht wird.

Reagentien. 1. Abs. Alkohol, 2. 1%ige alkoholische Lösung NaBH₄, Metal Hydrides Incorporation Beverly, Mass. Congress Street, 3. Eisessig p.A., 4. Methylenchlorid, über Natriumsulfat getrocknet.

Hydrolyse und Extraktion der Lipoidfraktion des Harns wird wie bei der Pregnantriolbestimmung ausgeführt. Der Trockenrückstand der Ketonfraktion wird in 1 cm³ von 1 aufgenommen, mit 1 cm³ frisch bereitetem 2 versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen, nach Zugabe von 3 Tropfen 3 wird der Alkohol im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 20 cm³ 4 aufgenommen und zur Entfernung des in Methylenchlorid unlöslichen NaBH₄ mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt. Die blanke Methylenchloridphase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Die Bestimmung des entstandenen Pregnantriols wird nach LANGECKER (1) ausgeführt. In Zusatzversuchen von 1 zu Harn konnten 60–70% wiedergefunden werden. WITZEL erreichte bei der Reduktion von reinem 1 (100 mg) in 2%iger alkoholischer Lösung 84% Ausbeute. Wenn das Oxyprogesteron-capronat ungespalten im Harn auftreten sollte, wird es nach entsprechenden Kontrollversuchen unter den verwendeten Hydrolysebedingungen nicht erfaßt. Es ist als Ester eines tertiären Alkohols schwer spaltbar (HUEBENER).

Bei der Reduktion mit NaBH₄ werden auch in 3-Stellung reduzierte Verbindungen (Pregnan-3,17-diol-20-on), die nach DORFMANN als erstes Abbauprodukt von 1 zu erwarten wären, der Bestimmung als Pregnantriol zugänglich: reines 3,17- α -Oxy - Δ_4 Pregnenolon wurde in der Girard-Fraktion nach Reduktion mit NaBH₄ und nachträglicher Oxydation mit Perjodat zu 80% wiedergefunden, Zusätze zum Harn allerdings nur zu 40%.

Die Corticoide wurden nach LANGECKER 2 bestimmt, Cortison nach COSTE u. DELBARRE.

In Abb. 1 ist die Ausscheidung der Metabolite je Tag wiedergegeben. Die niedrigen Werte für Pregnantriol, Oxyprogesteron, Cortison können nur als approximativ betrachtet werden. Unter Berücksichtigung der Mittelwerte der Vor- und Nachperiode erkennt man, daß die 17-Ketosteroide sicher nicht vermehrt ausgeschieden werden, die Pregnantriolausscheidung sogar erniedrigt und die Pregnantriolausscheidung nur ganz geringfügig erhöht ist. 1 und (Pregnan-3,17-diol-20-on) ist nur in Spuren faßbar gewesen, auch unter Berücksichtigung der schlechten Ausbeuten bei der Analyse. Die Corticoide bzw. Cortison zeigen keine Zunahme.

Man muß annehmen, daß 1 beim Menschen nur in Spuren unverändert ausgeschieden wird, was mit dem Befund von BURSTEIN bezüglich 21-Desoxycortison übereinstimmt. Der Abbau geht über die Reduktion der 20-Ketogruppe hinaus. Es wäre allerdings möglich, daß unter der verwendeten milden Säurehydrolyse Glucuronide von Pregnan-3,17-diol-20-on bzw. Pregnantriol nicht voll erfaßt wurden. Es sind daher noch Versuche mit Fermenthydrolyse im Gang, die klarstellen sollen, wie weit die 17-Oxygruppe den Abbau der Progesteronseitenkette beeinflusst. Die erniedrigte Pregnantriolausscheidung läßt an eine kompetitive Stoffwechselverschiebung denken, wie sie von KAISER für den endogenen und exogenen Progesteronstoffwechsel unter dem Einfluß von Testosteron beschrieben ist. Unsere Versuche haben keinen Anhaltspunkt dafür gegeben, daß 17-Oxyprogesterongabe eine Erhöhung der 17-Ketosteroidausscheidung zur Folge hat, was gegen die Annahme von PFIFFNER bzw. von VON EUW

spricht, hingegen mit den Befunden von BURSTEIN bezüglich 21-Desoxycortison übereinstimmt. Dazu kommt noch, daß BIRKE nur bei einem

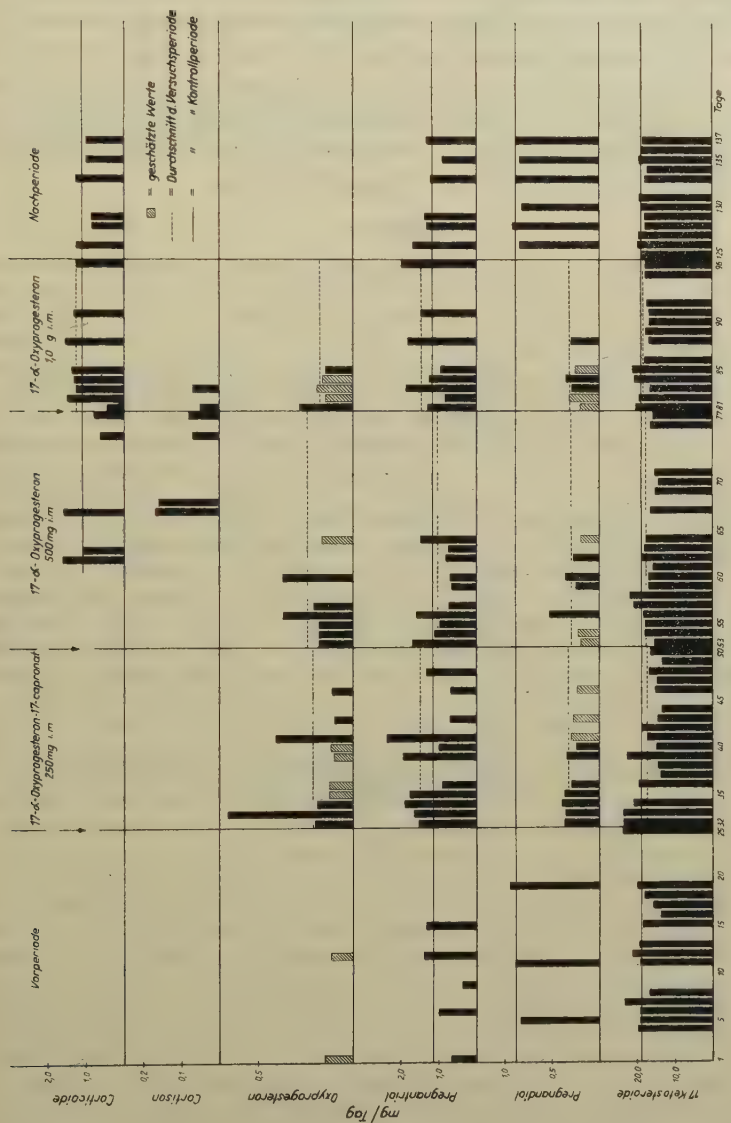


Abb. 1. Die Ausscheidung von Oxyprogesteron und seinen Metaboliten im menschlichen Harn nach intramuskulärer Verabreichung.

von drei Kranken mit normaler Nebenniere nach der Verabreichung von 100 mg REICHSTEIN-Substanz S als freien Alkohol eine Zunahme der 17-Ketosteroidausscheidung feststellen konnte.

Zusammenfassung.

Es wird bei einer normalen männlichen Versuchsperson nach intramuskulärer Verabreichung von 17- α -Oxyprogesteron im Harn die Ausscheidung von 17-Ketosteroiden, Pregnandiol, Pregnantriol, Corticoiden, Cortison und Oxyprogesteron verfolgt. Die Ausscheidung der 17-Ketosteroide, Corticosteroide und Cortison bleibt unbeeinflusst. Oxyprogesteron ist gelegentlich in Spuren nachweisbar gewesen. Die Pregnandiol-Ausscheidung war vermindert, die Pregnantriol-Ausscheidung gelegentlich etwas erhöht.

Literatur.

BIRKE, G.: Acta endocrinol. (Copenh.) **15**, 17 (1954). — BONGIOVANNI, A. M.: (1) Bull. Hopkins Hosp. **92**, 244 (1953). — BONGIOVANNI, A. M. (2), W. R. EBERLEIN and J. CARA: J. clin. Endocrin. **14**, 409 (1954). — BURSTEIN, S., K. SAVARD and K. DOREMAN: Endocrinology **53**, 267 (1953). — COSTE, F., et F. DELBARRE: Presse méd. **61**, 46 (1953). — DIBBELT, L., K. HINSBERG u. H. ESSER: Hoppe-Seylers Z. **289**, 153 (1952). — DORFMANN, R. I.: Rec. Prog. Horm. Res., **IX**, 5 (1954). — EUW, J. VON, u. T. REICHSTEIN: Helvet. chim. acta **24**, 879 (1941). — FIESER, L. F., and M. FIESER: Natur. Prod. Relat. to Phenanthren, III. New York: Reinhold Publishing Corporation 1949. — FUKUSHIMA, D. K., K. DOBRINER and T. F. GALLAGHER: Federat. Proc. **10**, 185 (1951). — GOLDFINE, M. M., and S. L. COHEN: Endocrinology **52**, 597 (1953). — HUEBENER, H. J., u. J. G. H. SCHMIDT: HOPPE-SEYLER's Z. **296**, 246, (1954). — JAILER, J. W.: (zit. nach BONGIOVANNI (2)). — KAISER, R.: Klin. Wschr. **1954**, 495. — LANGECKER, H.: (1) Biochem. Z. **325**, 16 (1953). — (2) Klin. Wschr. **1952**, 906. — LIEBERMANN, S., and S. TEICH: Pharmacol. Rev. **3**, 285 (1953). — PFIFFNER, J. J., and H. B. NORTH: (1) J. Biol. Chem. **140**, 161 (1941). — (2) J. Biol. Chem. **139**, 855 (1941). — TALBOT, N. B., R. A. BERMAN, E. I. McLACHLAN and J. K. WOLFE: J. clin. Endocrin. **1**, 668 (1941). — WITZEL, H.: unveröffentlicht.

Prof. Dr. HEDWIG LANGECKER, Hauptlaboratorium der Schering A.G.,
Berlin N 65, Müllerstr. 170/2.

Aus der Chirurgischen Abteilung des Landeskrankenhauses Müzzzuschlag
(Vorstand: Prof. Dr. HANS BRÜCKE).

Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Gallensäuren und Scopolamin-N-butylbromid (Buscopan) auf die Motorik des Darmes.

Von

M. BERGMANN.

(Eingegangen am 26. Juni 1954.)

Zweck folgender Mitteilung soll ein experimenteller Beitrag zur Frage der peristaltischen Wirksamkeit der Galle sein. In letzter Zeit wurde von BRÜCKE u. Mitarb. auf die peristaltikauslösende Eigenschaft der Gallensäuren in mehreren Arbeiten hingewiesen.

Während die peristaltische Wirkung der Galle als solche sehr lange bekannt war, haben erst die Untersuchungen von EMELIN, A. G. MAYER u. MCEWEN, SINGER u. GLÄSSNER die Gallensäuren als den wirksamen Faktor erkannt. Völlig unklar blieb zunächst die Frage nach dem Wirkungsmechanismus. Es lag der Gedanke nahe, es könnte sich dabei um eine reine Oberflächenwirkung der Gallensäuren handeln. BRÜCKE u. CAITHAML konnten jedoch nachweisen, daß Seifenlösungen in keiner Weise denselben peristaltischen Effekt zeigen wie Gallensäuren. Auch BRÜCKE u. HELLAUER kamen bei ihren vergleichenden Untersuchungen einzelner Gallensäuren zur Erkenntnis, daß die Oberflächenaktivität jedenfalls nicht allein der entscheidende Faktor sein könne. Obwohl eine gewisse Ähnlichkeit mit der von ROTHLIN u. SCHALCH bei der Untersuchung der Oberflächenaktivität gefundenen Reihenfolge bestand, glaubten sich die beiden Autoren doch nicht berechtigt anzunehmen, daß dies auf einen direkten ursächlichen Zusammenhang hindeute. Es war nun in der Darmschleimhaut selbst der Angriffspunkt zu suchen und anzunehmen, daß von dort die Erregung über den MEISSNERSchen und AUERBACHSchen Plexus weitergeleitet werde. Von dieser Vorstellung ausgehend, konnten wir in einer früheren Arbeit zeigen, daß verdünnte Lösungen verschiedener Gallensäuren in den Bindehautsack des Auges gebracht, beim Versuchstier einen wechselnd starken Cornealreflex auslösten. Dabei fand BERGMANN die gleiche Reihenfolge wie BRÜCKE u. CAITHAML am Darm. In der Hoffnung, in unseren Untersuchungen einen Schritt weiterzukommen, verwendeten wir das Hyoszin-N-butylbromid „Buscopan“¹. Wick konnte einen mit Pilocarpin erzeugten Spasmus der Darmmuskulatur im Tierexperiment mit Buscopan völlig zum Schwinden bringen und erzielte damit den gleichen Effekt wie mit Atropin. Dagegen hatte Buscopan auf den mit Acetylcholin gereizten Darm nur eine sehr geringe Hemmwirkung, die 100—500 mal schwächer war als die des Atropins in gleicher Versuchsanordnung.

¹ Der Firma C. H. Boehringer & Sohn, Ingelheim am Rhein, sei für die zur Verfügung gestellten Versuchsmengen herzlichst gedankt.

Wir stellten uns daher 2 Fragen:

1. Wie verhält sich die Hemmwirkung des Buscopan an dem von Gallensäuren erregten Darm?
2. Rufen die Gallensäuren an dem durch Buscopan in seiner Motilität blockierten Darm eine Peristaltik hervor?

Versuche.

In orientierenden Vorversuchen gaben wir Patienten vor oder nach Galleklysmen 20 mg Buscopan i.v. und konnten dabei folgendes beobachten:

Bei der Verabreichung von Buscopan, etwa 5—10 min nach dem Galleklyσμα, hatten die Patienten, so wie gewöhnlich nach Galleinläufen, Stuhlgang, vielleicht mit einer gewissen Verzögerung, jedoch ohne die spastischen Schmerzen im After, wie wir sie häufig bei Galleklyσμα beobachten können. Der Stuhlgang war „leichter“. Es schien, daß Buscopan den bereits durch Galle in Tätigkeit gesetzten Peristaltikablauf nicht mehr vollständig hemmen, aber doch die Stärke der peristaltischen Wirksamkeit etwas herabzusetzen vermöge. Gab man die Buscopaninjektion dagegen einige Minuten vor dem Galleklyσμα, so trat meist eine starke Verzögerung der Defäkation auf. Man bekam den Eindruck, als ob die Galle in dem durch das Buscopan blockierten Darm nicht zur Wirkung käme.

Die weiteren Versuche verdanken wir einem Pat., bei dem ein Darmprolaps mit Ausstülpung des Coecums bestand. Es handelte sich um einen 69 Jahre alten Mann, der vor 30 Jahren bei einem Unfall eine Nierenruptur und eine stumpfe Darmverletzung erlitt. Die nach außen gestülpte Darmschleimhaut in Größe einer Kinderfaust steht nach wie vor unter dem Einfluß der autonomen Darmperistaltik und stellte so ein selten geeignetes Objekt für unsere Versuche dar.

Bei den Versuchen wurde die Darmschleimhaut mit Gallensäurelösungen berieselt. Verwendet wurden Lösungen von Cholsäure, Glykochol-, Taurochol-, Apochol-, Desoxyloch- oder Dehydrodesoxycholsäure in einer Verdünnung 1:100. Dabei kam es zu verschiedenen starken peristaltischen Wellen, teilweise mit einer Kontraktion des Prolapses bis zu einem Viertel seiner Größe und einer teilweise auffallend starken Hyperämisierung. Es zeigte sich bei der Chol- und Glykocholsäure ein deutlich stärkerer Effekt als bei den anderen geprüften Lösungen. Am schwächsten war das Ergebnis bei der Apocholsäure.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden dem Patienten 20 mg Buscopan i.v. gegeben. Ungefähr 2—3 min nach der Injektion hörte jede Darmperistaltik auf. Der Prolaps wurde schlaff, vergrößerte sich auf mehr als das Doppelte und die vorher gut durchblutete Darmschleimhaut wurde blaß. Nach etwa 15—20 min trat die erste schwache peristaltische Welle auf, um nach einer weiteren Pause von 5—10 min zum normalen Kontraktionsablauf zurückzukehren.

Als nächstes wurde an verschiedenen Tagen die prolabierte Darmschleimhaut mit den oben beschriebenen Lösungen berieselt und nach Auftreten der verstärkten Peristaltik, meist nach 5—10 min, wurden 20 mg Buscopan i.v. gegeben. Dabei kam es jedesmal zu einer prompten Erschlaffung des Prolapses bei völligem Sistieren der Peristaltik. Nach weiteren 10—15 min traten wieder die ersten schwachen peristaltischen Wellen auf, worauf sich allmählich die normale Peristaltik einstellte. Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen gingen wir umgekehrt vor und berieselten den Darm, *nachdem er mit Buscopan zum Erschlaffen gebracht war*, mit den Gallensäurelösungen. Darauf reagierte die Darmschleimhaut vorerst überhaupt nicht. Erst nach Abklingen der Buscopanwirkung unter stetem Berieseln traten nach 10—15 min wieder 1 oder 2 Kontraktionen auf, wobei bis zum Einsetzen der nächsten Welle abermals einige Minuten verstrichen.

Wir sehen also nach i.v. Verabreichung von Buscopan ein Erschlaffen des Darmes und ein Sistieren der Peristaltik. Dabei besteht kein Unterschied, ob die Schleimhaut zuvor mit Gallensäuren berieselt wurde oder nicht.

Nach den Versuchen von WICK würde die Wirkung der Gallensäuren der des Pilocarpins und nicht der des Acetylcholins entsprechen; die Annahme einer von der Darmschleimhaut ausgehenden reflektorischen Wirkung der Gallensäuren am Darm wird durch unsere Befunde gestützt.

Zusammenfassung.

Versuche am Menschen über die konkurrierende Wirkung von Gallensäuren und Hyoszin-N-butylbromid stützen die bereits früher gemachte Annahme, daß die peristaltikauslösende Wirkung der Gallensäuren am Darm durch einen von der Schleimhaut ausgehenden Reflex zustande kommt.

Literatur.

BERGMANN, M.: Wien. klin. Wschr. **1952**, 961. — BRÜCKE, H., u. W. CAITHAML: Klin. Med. (Wien) **1950**, 29. — BRÜCKE, H., u. H. HELLAUER: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **4**, 3—4 (1951). — EMELIN, N.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **42**, 91 (1941). — FUBINI, L., u. M. LUZZATI: Zit. n. A. SCHÜPBACH. — ROTHLIN, E., u. W. R. SCHALCH: Helvet. physiol. Acta **2**, 2 (1944). — MEYER, A. E., and J. P. McEWEN: Amer. J. Physiol. **153**, Nr. 2, 386 (1948). — SCHÜPBACH, A.: Z. Biol. **51**, NF 33, 1 (1908). — SINGER, G., u. K. GLÄSSNER: Wien. klin. Wschr. **1910**, 5. — WICK, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 485 (1951).

Dr. M. BERGMANN, Mürzzuschlag/Steiermark,
Chirurgische Abteilung des Landeskrankenhauses.

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Asta-Werke AG.,
Chemische Fabrik, Brackwede i. W.
und dem Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik, Freiburg i. Br.

Zur pharmakologischen Charakterisierung vegetativer Pharmaka am Gewebsstoffwechsel der Speicheldrüse.

I. Spasmolytica und „Ganglienblocker“*.

Von

NORBERT BROCK und HERMANN DRUCKREY.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Juni 1954.)

I. Begriffsbildung und Entwicklung der Problematik.

Im Rahmen einer pharmakologischen Charakterisierung „vegetativer“ Pharmaka kommt der Frage des Angriffspunktes und des Wirkungsmechanismus besondere Bedeutung zu. Im Hinblick auf die antagonistische Wirkung gegenüber den Reaktionen der körpereigenen Überträgerstoffe sowie unter Berücksichtigung des Wirkortes unterscheiden wir heute z. B. die Gruppe der Anticholinergica (Parasympathicolytica, Typ: Atropin), die Gruppe der Antiadrenergica bzw. Antiarterenergica (Sympathicolytica, Typ: Ergotamin) und die Gruppe der ganglienblockierenden Substanzen (ganglionic blockers, Typ: Nicotin).

Demgegenüber geht die Bezeichnung „Spasmolytica“, die auch für zahlreiche vegetative Pharmaka verwendet wird, von der *therapeutischen* Indikation aus. Sie ist deshalb pharmakologisch nicht einheitlicher Natur und umfaßt all die Substanzen, die *klinisch* zur Behandlung spastischer Zustände der glatten Muskulatur Verwendung finden. Eine Aussage, an welcher Stelle der Angriffspunkt eines Spasmolyticums im Einzelfalle liegt, ist aus dem beobachteten Effekt, der Beseitigung des Spasmus, nicht ohne weiteres möglich. Die Klärung dieser Frage muß vielmehr auf dem Wege einer pharmakologischen Analyse erfolgen.

Im einzelnen ist zu entscheiden, ob eine Substanz — ähnlich wie Atropin — die Wirkung des Acetylcholins an den cholinergischen Nervenenden aufhebt (Anticholinergicum), ob sie — wie Papaverin — zu einer reversiblen Lähmung der glatten Muskelfaser selbst führt, also eine „myotrope“ Wirkung hat, oder ob sie — wie etwa Avacan — über beide Wirkkomponenten verfügt. Darüber hinaus muß eine Abgrenzung gegenüber den sogenannten Ganglienblockern erfolgen. Auch diese werden klinisch gelegentlich zur Bekämpfung von Spasmen der glatten Muskulatur eingesetzt³, wenngleich ihre Hauptbedeutung doch wohl auf dem Gebiet des

* Herrn Professor Dr. FRITZ EICHHOLTZ zum 65. Geburtstag gewidmet.

Kreislaufs liegt (z. B. in der Erzeugung einer „kontrollierten Hypotonie“¹⁸). Bei verschiedenen Angriffspunkten eines Pharmakons ist für die Einordnung im allgemeinen die stärkst ausgeprägte, d. h. die „spezifische“ Wirkkomponente, maßgebend.

1. *Pharmakologische Charakterisierung von Spasmolytica.*

Die Untersuchung vegetativer, insbesondere spasmolytisch wirksamer Substanzen, erfolgt im allgemeinen zunächst an kontrahierten *glattmuskulären* Organen, zumeist mit der Methode von MAGNUS, wobei die Kontraktion einerseits durch muskulär angreifende Pharmaka (z. B. durch BaCl_2 oder Histamin), andererseits durch Cholinergica bedingt sein kann. Von dieser verschiedenen Ausgangslage aus läßt sich die *Richtung* der pharmakologischen Wirkung vielfach bereits in wenigen Versuchen übersehen und auch quantitativ verfolgen¹¹.

Die Frage nach den *Charakter* der Wirkung läßt sich jedoch am muskulären Organ nicht eindeutig beantworten. Die Schwierigkeit der Entscheidung liegt in den Besonderheiten der contractilen Substanz begründet und wird dadurch hervorgerufen, daß Kontraktionen, vor allem cholinergisch bedingte, auch durch Substanzen mit unspezifischer, muskulär lähmender Wirkung „gelöst“ werden können; denn bei Lähmung der Muskelzelle selbst muß jeder Reiz, der zentralwärts seinen Ursprung hat, unwirksam werden. Der meßbare Effekt im pharmakologischen Testversuch ist dabei stets der gleiche, ob nun die Lösung eines Spasmus auf einem spezifischen Acetylcholin-Antagonismus oder auf einer unspezifischen Lähmung der Muskelzelle beruht. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit solche spasmolytischen Effekte tatsächlich spezifischer Natur oder nur durch die Besonderheiten der contractilen Substanz bedingt sind.

Eine Unterscheidung ist oft dadurch möglich, daß die wirksamen Dosen für die mehr unspezifische, muskulär lähmende Wirkung im allgemeinen um mehrere Größenordnungen höher liegen als für die spezifische anticholinergische. Meist sind es allein diese rein quantitativen Unterschiede in den wirksamen Dosen, auf die sich eine Beurteilung in praxi stützen kann.

So liegt die Wirksamkeit des „echten“ Anticholinergicums Atropin am Acetylcholinspasmus des Ileums z. B. vom Meerschweinchen etwa in der Größenordnung 10^{-8} , am muskulär (z. B. durch Bariumchlorid) bedingten Krampf dagegen erst in der Größenordnung von 10^{-4} . Die wirksame Konzentration des rein „myotropen“ Papaverins liegt dagegen sowohl am Bariumchlorid- als auch am Acetylcholinkrampf in der gleichen Größenordnung von 10^{-5} . Deshalb fällt in dem vorliegenden Beispiel die Entscheidung nicht schwer, den Atropineffekt auf die acetylcholinbedingte Kontraktur als „spezifisch“ anzuerkennen, die Papaverinwirkung dagegen — unspezifisch — auf eine Lähmung der contractilen Substanz zu beziehen. Es versteht sich aber von selbst, daß solche quantitativen Unterschiede nur sehr bedingt Rückschlüsse auf qualitative Wirkungsverschiedenheiten erlauben.

Angesichts der Bedeutung dieser Fragen für die nähere Charakterisierung der betrachteten Wirkungen erscheint es nützlich, zuvor die

Frage der Spezifität einer pharmakologischen Wirkung überhaupt näher zu beleuchten. Sie läßt sich nach 3 Kriterien beurteilen¹⁵: Erstens muß die Wirkung auf eine spezielle biologische Funktion beschränkt sein, zweitens nur bestimmten Substanzen zukommen und drittens durch kleine Dosen des Pharmakons zu erzielen sein. Nur dann, wenn alle 3 Bedingungen erfüllt sind, liegt im strengen Sinn eine spezifische Wirkung vor. Für die Beurteilung der Spezifität vom therapeutisch-klinischen Standpunkt aus ist es darüber hinaus noch bedeutsam, ob die betrachtete Wirkung eines Pharmakons auch im Experiment innerhalb der therapeutisch üblichen Dosierung, d. h. in einer derselben entsprechenden Konzentration nachweisbar ist oder nicht.

Die Spezifität der Atropinwirkung auf die cholinergisch bedingte Erregung ist bekanntlich zu bejahen. Dagegen verdient der Effekt des Papaverins dieses Prädikat nicht ohne weiteres: Erstens sind zahlreiche organische und anorganische Substanzen von gänzlich verschiedener chemischer Struktur bekannt, die nur durch eine unspezifische Zellschädigung zu einer Lähmung der Muskelzelle führen, zweitens liegen beim Papaverin die wirksamen Dosen um Größenordnungen höher als beim Atropin, drittens haben Untersuchungen von DRUCKREY u. Mitarb. am Seeigelei¹⁵ und eigene Befunde an Paramaecien gezeigt, daß das Papaverin auch hier Zellfunktionen lähmt, und zwar durchaus in denselben Konzentrationen, die z. B. am isolierten Darm gebraucht werden. Die lähmenden Effekte des Papaverins sind also keineswegs auf eine spezielle Funktion beschränkt, sondern an allen möglichen Objekten und Zellen nachweisbar.

Bei zahlreichen anderen Substanzen fällt die Beurteilung ebenfalls schwer; dies ist stets dann der Fall, wenn die erforderliche Konzentration zur Aufhebung des Acetylcholinspasmus wesentlich höher liegt als beim Atropin und sich so größenordnungsmäßig der des Papaverins nähert. So ist z. B. im Bereich der wirksamen Konzentrationen zwischen 10^{-4} und 2×10^{-6} die Entscheidung der Frage nach der *Natur* der Wirkung am isolierten muskulären Organ allein nicht mehr zu treffen, da hier eine spezifische anticholinergische Wirksamkeit von einer unspezifischen Wirkung auf die contractile Substanz überlagert sein kann.

An *drüsigen* Organen dagegen müßte eine Differenzierung zwischen diesen beiden Wirkkomponenten möglich sein, da hier die bei muskulären Geweben zu berücksichtigenden Besonderheiten fehlen und deshalb nicht stören können. Solche Untersuchungen sind in der Vergangenheit nur selten durchgeführt worden, weil sie methodisch wesentlich schwieriger sind als Untersuchungen an muskulären Geweben; sie sind jedoch erforderlich, um der Gefahr einer einseitigen Beurteilung zu entgehen.

In der Literatur wurden gelegentlich auch Substanzen als spezifische „Anticholinergica“ oder als „neurale“ Spasmolytica angesprochen, obwohl eine sichere

Aussage auf Grund der durchgeführten pharmakologischen Experimente noch nicht möglich ist, weil diese sich auf muskuläre Organe beschränkt haben.

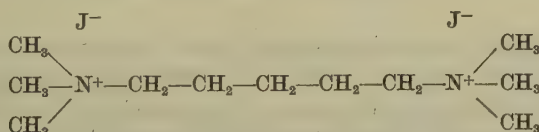
So untersuchte z. B. GORDONOFF die Wirkung des Nicotinyll-1,2-diphenyl-äthans am isolierten Kaninchendarm. Die wirksamen Konzentrationen zur Lösung der Spasmen, die durch Bariumchlorid bzw. Acetylcholin herbeigeführt waren, lagen zwischen 5×10^{-4} und 5×10^{-5} , am kombinierten Krampf ($\text{BaCl}_2 + \text{Acetylcholin}$) bei 5×10^{-4} . Atropin dagegen zeigte am Acetylcholinspasmus bei einer Konzentration von 10^{-6} noch eine komplette Lösung.

Trotz dieser geringen pharmakologischen Aktivität der Nicotinsäureverbindung — insbesondere gegenüber Acetylcholin — wurde der weitreichende Schluß gezogen, daß es sich hier um ein Spasmolyticum mit kombinierter — also „myogener und neurogener“ — Wirkung handelt. Abgesehen davon, daß die mitgeteilten Befunde für eine derartige Entscheidung wohl noch nicht ausreichen, ist die Annahme einer spezifischen anticholinergischen Wirkkomponente in diesem Wirkungsbereich von vornherein wenig wahrscheinlich, vielmehr liegt es wesentlich näher, den Gesamteffekt auf eine unspezifische Lähmung der Muskelzelle zu beziehen.

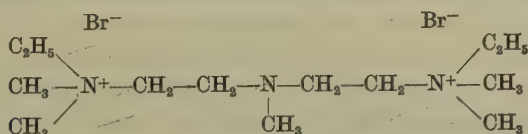
2. Abgrenzung zwischen ganglienblockierenden Substanzen und Anticholinergica.

Hinsichtlich der Abgrenzung der eigentlichen Anticholinergica gegenüber den sogenannten „Ganglienblockern“ sind in letzter Zeit Unklarheiten und Schwierigkeiten aufgetaucht. Aus diesem Grunde bezogen wir diese Gruppe ebenfalls in den Kreis unserer Untersuchungen mit ein. 4 Verbindungen mit ganglienblockierenden Eigenschaften sind in besonderem Maße bekannt geworden: Tetraäthylammoniumbromid, Pentamethylen-bis-trimethylammoniumdijodid („Pentamethoniumjodid“), Hexamethylen-bis-trimethylammoniumdijodid („Hexamethoniumjodid“) und N,N,N',N'-3-Pentamethyl-N,N'-diäthyl-3-aza-pentyl-1,5-diammoniumdibromid („Pendiomid“).

Während es sich bei den Spasmolytica im allgemeinen um *tertiäre* Basen handelt, stellen die sogenannten „Ganglienblocker“ *quartäre* Ammoniumbasen dar, deren Struktur durch die *beherrschende* Stellung der quartären Stickstoffatome im Rahmen des Gesamtmoleküls charakterisiert ist (vgl. Formeln).

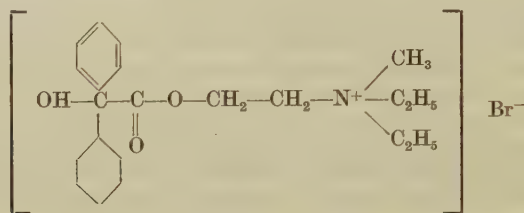


Pentamethylen-bis-trimethylammoniumdijodid „Pentamethoniumjodid“.

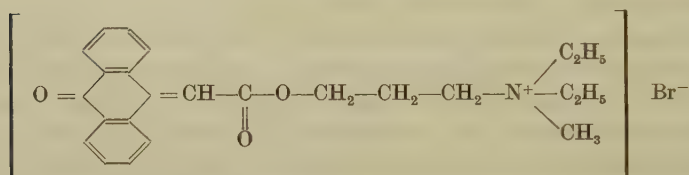


N,N,N',N'-3-pentamethyl-N,N'-diäthyl-3-aza-pentyl-(1,5)-diammonium-dibromid, „Pendiomid“.

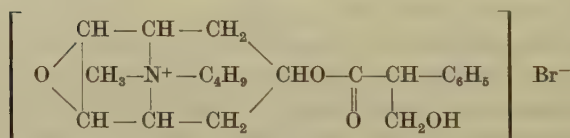
Neuerdings haben auch in der Reihe der Anticholinergica einige Derivate mit *quartärem* Stickstoff therapeutische Verwendung gefunden, so vor allem das Brommethylat des Phenyl-cyclohexyl-oxycyessigsäure-diäthylamino-äthylesters („Antrenyl“), das Brommethylat des β -Diäthyl-aminoäthyl-xanthen-9-carbonsäureesters („Methanthelin“) sowie das Scopolamin-N-butylbromid.



Brommethylat des Phenyl-cyclohexyl-oxycyessigsäure-diäthylamino-äthylesters, „Antrenyl“.



Brommethylat des β -Diäthyl-aminoäthyl-xanthen-9-carbonsäureesters, „Methanthelin“.



Scopolamin-N-butylbromid.

Die pharmakologische Beurteilung dieser Substanz ist nicht einheitlich. Ein Teil der Autoren² vertritt die Auffassung, daß durch Überführung des tertiären in den quartären Stickstoff nur eine Beeinflussung der Wirkungsintensität bemerkbar wird, der Wirkungscharakter eines Anticholinergicums sich dagegen nicht wesentlich verändert; andere Autoren glauben dagegen den Nachweis erbracht zu haben, daß die „tertiären Anticholinergica“ durch Quaternisierung ihre Wesensart verlieren und die Eigenschaften echter „Ganglienblocker“ annehmen. Für das Scopolamin-N-butyl-bromid erfolgte sogar noch eine weitere Differenzierung, indem diese Substanz als „vagaler Ganglienblocker“ charakterisiert wurde²⁵.

Die Klärung dieser Fragen wird dadurch erschwert, daß auch die „tertiären Anticholinergica“, z. B. Atropin, die intraganglionäre Erregungsübertragung zu hemmen vermögen, allerdings erst in Dosen, die weit höher liegen als jene, durch die die peripheren Funktionen gehemmt werden. Da es, wie wir eingangs ausführten, üblich und notwendig ist, nur die im *therapeutischen* Dosierungsbereich beherrschende Wirkkomponente der pharmakologischen Charakterisierung sowie der daraus folgenden Nomenklatur zugrunde zu legen, gilt Atropin allgemein als Anticholinergicum und nicht als Ganglienblocker.

Um die Verwirrung, die sich auf diesem Gebiete auszubreiten drohte, einzudämmen, haben BEIN, GROSS, SCHULER u. TRIPOD die Wirkung dieser neuen „quartären Anticholinergica“ in zahlreichen Versuchsanordnungen zu Atropin und Pendiomid in Beziehung gesetzt, um beurteilen zu können, ob diese Substanzen den Wirkungscharakter eines Anticholinergicums oder eines Ganglienblockers besitzen. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind am Beispiel des Scopolamin-N-butylbromids unter Bezug auf Atropin und Pendiomid in Tab. 1 zur Darstellung gebracht:

Tabelle 1. Vergleich der Wirksamkeit von Scopolamin-N-butylbromid mit Atropin und Pendiomid unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Ergebnisse aus der Arbeit von BEIN, GROSS, SCHULER u. TRIPOD².

Test (gegen)	Pendiomid	Scopolamin-N-butylbromid	Atropin
Isolierter Kaninchendünndarm (Acetylcholin-Kontraktur)	∅ (bis 10 ⁻²)	+	+
Isoliertes Froschherz (Acetylcholin).	∅	+	+
Isolierter Kaninchendünndarm (Spontanmotorik)	∅	+	+
Katze (Blutdrucksenkung durch Acetylcholin)	∅	+	+
Vagusreizung	+	+	+
Kreislauf (Acetylcholin)	∅	+	+
Katze, Ganglion cervicale superius (präganglionäre elektrische Reizung)	0,3 mg/kg i.v. völlige Hemmg. d. Reizübertragung, lange Wirkungsdauer	1,0 mg/kg i.v. ganz schwacher flücht. Effekt	1,0 mg/kg i.v. ganz schwacher flücht. Effekt
Nicotintoxizität (1,25 mg/kg i.v.) (Schutz gegen Nicotin)	+	(+)	∅
	(4 mg/kg s.c.)	(400 mg/kg s.c.)	

+ = Antagonismus; ∅ = kein Antagonismus.

Aus diesen Befunden von BEIN u. Mitarb. geht ganz klar hervor, daß die Wirksamkeit von Scopolamin-N-butylbromid in allen Versuchsanordnungen mit derjenigen des Atropins und nicht mit der des Pendiomids übereinstimmt. Wie Scopolamin-N-butylbromid verhielten sich qualitativ auch Antrenyl und Methanthelin. Darüber hinaus stellten die genannten Autoren fest^{1, 2}, daß die beobachteten peripheren anticholinergischen Effekte der erwähnten „quartären Anticholinergica“ bereits in wesentlich niedriger Dosierung auftraten als die Wirkungen, die auf der Hemmung der intraganglionären Erregungsübertragung beruhen. Aus diesem Grunde lehnen BEIN u. Mitarb. eine Einordnung der Anticholinergica mit quartärem Stickstoff in die Gruppe der echten Ganglienblocker ab. Sie sehen in ihnen vielmehr typische Anticholinergica und bringen damit klar zum Ausdruck, daß die bevorzugte pharmakologische Wirkqualität in der Hemmung der peripheren, „muscarinähnlichen“ Komponente des Acetylcholins zu sehen ist.

Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch BROICHER bei der kritischen Bewertung der klinisch-therapeutischen Effekte von Antrenyl, Methanthelin und Scopolamin-N-butylbromid. Nach seiner Ansicht ist es keineswegs erwiesen, daß der bei starker Überdosierung in den pharmakologisch-tierexperimentellen Arbeiten beschriebene „ganglienblockierende“ Effekt auch beim Menschen so wesentlich ist, daß er therapeutisch einen Einfluß haben kann. Die beim Menschen beobachtete Wirkungsweise dieser Verbindungen könne vielmehr praktisch durch den parasymphaticolytischen Effekt *allein* erklärt werden. Wahrscheinlich bedürfe es wesentlich höherer und sicherlich toxischer Dosen dieser Substanzen, um überhaupt eine Wirksamkeit im Sinne der Ganglienblockade am Menschen zu erreichen.

ORZECZOWSKI vertritt ebenfalls die Auffassung, daß im Scopolamin-N-butylbromid der Einfluß der atropinartigen Grundstruktur über die Bedeutung der funktionellen quartären Stickstoffgruppe überwiegt, die klinische Wirkung dieser Substanz demnach eine atropinartige, parasymphaticolytische darstellt.

Von anderer Seite wird dagegen das Scopolamin-N-butylbromid trotz dieser umfassenden und klaren Ergebnisse auch weiterhin als „vagaler Ganglienblocker“ charakterisiert; seine Wirkung wird damit *einzig* auf eine Hemmung der Erregungsübertragung in den vagalen Ganglien bezogen, die Möglichkeit eines anticholinergischen Wirkmechanismus also nicht für wesentlich gehalten (vgl. z. B.^{13, 16, 19, 21}).

Aus diesem Grunde erschien es reizvoll und notwendig, eine Entscheidung auch dieser für die Therapie so wichtigen Fragen am drüsigen Organ zu versuchen und zu prüfen, ob die genannten „quartären Anticholinergica“ in der Tat eine spezifisch anticholinergische Wirkkomponente besitzen, wie dies von BEIN u. Mitarb. an muskulären Organen eigentlich überzeugend gefunden wurde.

II. Eigene experimentelle Untersuchungen am Gewebsstoffwechsel der Speicheldrüse.

1. Methodische Angaben.

Als Test diente die Messung des Stoffwechselablaufs von Gewebsschnitten der Speicheldrüse, der sich nach unseren sehr umfangreichen Erfahrungen durch hohe Gleichmäßigkeit auszeichnet („Ruhestoffwechsel“). Die Speicheldrüse hat den

weiteren großen Vorteil, daß an ihr sowohl *cholinergische* als auch *adrenergische* Pharmaka gesetzmäßig eine sehr charakteristische Reaktion des Stoffwechsels auslösen⁸. Dieser Erregungsstoffwechsel besteht in einem kurzfristigen, steilen Anstieg der Atmung (O_2 -Verbrauch) um 100—400% (Abb. 1, III). Dabei treten gleichzeitig säurebildende *Spaltprozesse* auf („aerobe Glykolyse“), die im Stoffwechsel des ruhenden Gewebes fehlen. Der Erregungsstoffwechsel kann durch wiederholte Gaben von Acetylcholin oder Adrenalin regelmäßig in gleicher Weise ausgelöst werden, sofern ein verwertbares Substrat, z. B. Glucose, vorhanden ist⁹. *Durch vorherigen Zusatz von Atropin kann nur die cholinergisch bedingte Erregung gesetzmäßig und vollständig unterdrückt werden*⁸. Die Speicheldrüse reagiert also spezifisch; das ist im Hinblick auf die geplanten Arbeiten wichtig.

Wir benutzten die „indirekte“ Methode zur manometrischen Messung des Gewebsstoffwechsels von O. WARBURG unter Beachtung unserer bereits früher mitgeteilten Erfahrungen^{4, 7, 8}. Als Objekt diente die Speicheldrüse (Glandula submaxillaris) von Katzen. Sie wurde unmittelbar nach dem Tode steril entnommen und in eisgekühlter bicarbonatarmer RINGER-Lösung aufbewahrt. Die Herstellung der Schnitte erfordert Sorgfalt. Die Reaktionsgefäße hatten 2 Anhangsbirnen für die Aufnahme der zu untersuchenden Substanzen, die somit — in isotoner NaCl-Lösung gelöst — bei geschlossenem System zu beliebiger Zeit in den Reaktionsraum übergekippt werden konnten. Die Konzentrationen der vorpipettierten Stammlösungen wurden so gewählt, daß die erforderliche Dosis nach Möglichkeit in einer Flüssigkeitsmenge von 0,01 ml auf 1 ml RINGER-Lösung zur Einwirkung gelangte; die Konzentration der Wirkstoffe in dem jeweiligen Gefäßpaar war also gleich, ihre Menge dagegen — entsprechend dem Flüssigkeitsvolumen — verschieden. Auf die Problematik dieses Vorgehens wurde bereits früher verwiesen⁸. Die Konzentrationsangaben bezeichnen stets die Endkonzentration im Reaktionsgefäß.

Grundsätzlich untersuchten wir zunächst die Eigenwirkung der Substanzen auf den Ruhestoffwechsel. In anschließenden Versuchen wurde dann die Auslösbarkeit des Erregungsstoffwechsels nach vorheriger Gabe der zu prüfenden Substanzen ermittelt, wobei stets eine Erregungsreaktion für sich gemessen und als Kontrolle gegenüber den anderen Ansätzen verwendet wurde. Gleichzeitig waren außer dem „Thermobarometer“ noch weitere Parallelansätze ohne Gewebe eingeschaltet, um zu klären, ob die eingekippten Substanzen nicht bereits an sich schon zu einer Druckänderung führten, die dann durch eine Korrektur zu berücksichtigen war. Das war aber nur bei Verwendung höherer Konzentrationen ($> 10^{-4}$) erforderlich.

Bei der quantitativen Prüfung der parasympathicolytischen Wirksamkeit wurde die Konzentration, die den Erregungsstoffwechsel in wenigstens 3 von 4 Fällen völlig verhinderte, als „wirksame Grenzkonzentration“ festgelegt; sie diente dann als Grundlage zur vergleichenden Beurteilung.

Unter diesen quantitativen Gesichtspunkten untersuchten wir vergleichend zunächst die Wirkungen des *Atropins* als des Typs einer anticholinergischen, des *Papaverin* als des Typs einer myotropen und des *Pendiomid* als des Typs einer ganglienblockierenden Substanz. Ferner erschien es interessant, das d-Tubocurarin, das an den motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur als Antagonist des Acetylcholins wirksam ist, auch am drüsigen Organ auf etwaige anticholinergische Wirkungen zu prüfen. Durch diese Grundversuche sollte zunächst

geklärt werden, ob der Stoffwechseltest an Speicheldrüsengewebe zur Abgrenzung von „myotropen“ und „ganglionären“ Effekten und damit zum spezifischen Nachweis der anticholinergischen Wirkung überhaupt geeignet war. Erst nach diesem Nachweis konnte es sinnvoll erscheinen, die Untersuchungen auf die verschiedenen Gruppen der spasmolytischen und ganglienblockierenden Substanzen auszudehnen.

Dabei ergaben sich gelegentlich methodische Schwierigkeiten, die auf die rasche Verseifbarkeit der betreffenden Testsubstanzen unter den gegebenen Versuchsbedingungen (bikarbonathaltige RINGER-Lösung) zurückzuführen waren. Dies war z. B. bei Prüfung der basischen Ester Trasentin, Propivan und Syntropan der Fall, die nach dem Einbringen in die Versuchsgefäße rasch verseift und damit unwirksam wurden. Aus diesem Grunde lösten wir diese Ester in leicht saurem Milieu und kippten sie in jedem Falle erst unmittelbar im Versuch aus der Anhangsbirne in das Reaktionsgefäß. Die Testreaktion mit Acetylcholin mußte dann spätestens nach 20 min durchgeführt werden. Avacan erwies sich dagegen als so stabil, daß es ohne Einbuße der Wirksamkeit bereits vor Versuchsbeginn in den Ansatz selbst eingebracht werden konnte. Wir haben daraufhin die Verseifungsgeschwindigkeit der verschiedenen Ester in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen quantitativ verfolgt und werden hierüber andernorts berichten.

2. Atropin.

Zunächst untersuchten wir die Wirkung des Atropin (als Sulfat) auf den Ruhestoffwechsel. Außer einer vorübergehenden geringfügigen Senkung der Atmung war keinerlei charakteristische Beeinflussung des Ruhestoffwechsels erkennbar, spätestens 20 min nach der Atropin-Applikation war die Ausgangslage wieder erreicht.

Sodann bestimmten wir die zur Verhinderung des Acetylcholineffektes erforderliche „Grenzkonzentration“ Atropin. 20 min nach seiner Zugabe wurde Acetylcholin ($5 \cdot 10^{-7}$) eingekippt, um die Auslösbarkeit des Erregungsstoffwechsels zu prüfen. Dabei erwies sich eine Atropinkonzentration von 10^{-8} noch regelmäßig voll wirksam (Abb. 1, I); bei 10^{-9} war dagegen nach Acetylcholin stets wieder ein typischer Erregungsstoffwechsel nachweisbar (Abb. 1, III). In dem Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-9} schwankten die Ergebnisse. Gelegentlich war eine Erregungsreaktion zu beobachten, gelegentlich blieb sie aus; in einigen Fällen trat auch eine abgewandelte Reaktion ein, wobei zwar eine Atemsteigerung, jedoch keine aerobe Glykolyse meßbar wurde (Abb. 1, II). Eine derartige Übergangszone fand sich auch bei Prüfung anderer Anticholinergica. Die wirksame Grenzkonzentration für Atropin lag also bei 10^{-8} , damit etwa in der gleichen Größenordnung wie am glattemuskulären Organ und wie bei der therapeutischen Anwendung am Menschen. Das atropinisierte Speicheldrüsengewebe reagierte dagegen auf *Adrenalin* sogar noch unter einer Atropin-Konzentration von 10^{-6} mit dem typischen Erregungsstoffwechsel. Die hohe Spezifität des *Atropin* konnte damit auch im Stoffwechseltest eindeutig belegt werden.

Diese Beobachtungen zeigen, wie außerordentlich differenziert das Reaktionsvermögen der Drüse unter unseren Versuchsbedingungen ist. Die Speicheldrüsenschnitte erwiesen sich damit als lebendes Gewebe normaler Reaktionsfähigkeit, das auf physiologische und unphysiologische Reize in derselben Weise und bei der gleichen Dosierung reagiert, wie dies auch sonst im physiologischen und therapeutischen Bereich der Fall ist.

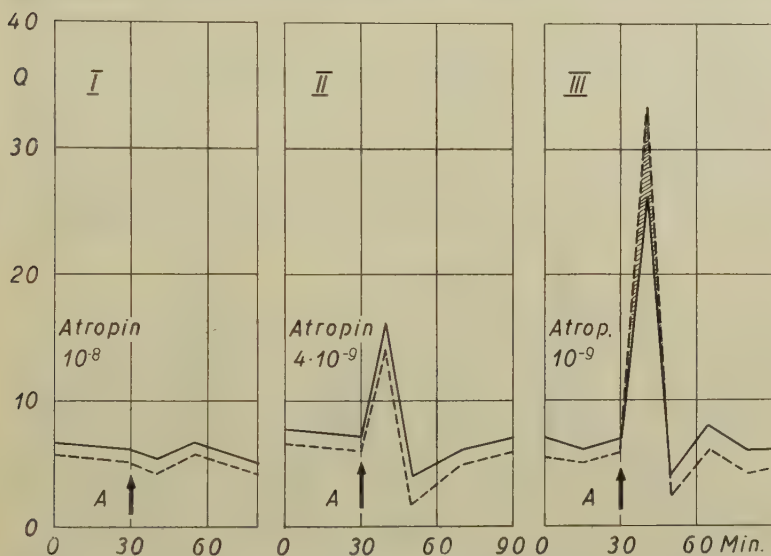


Abb. 1. Ermittlung der anticholinergischen Grenzkonzentration von Atropin im Stoffwechselversuch an Gewebsschnitten von Speicheldrüse. Kurve I. Nach Vorbehandlung mit Atropin 10^{-8} ist durch Acetylcholin kein Erregungsstoffwechsel mehr auslösbar. Kurve II. Wirkung von Acetylcholin nach Vorbehandlung mit Atropin 4×10^{-9} : atypische Erregungsreaktion (geringe Atemsteigerung, fehlende aerobe Glykolyse). Kurve III. Wirkung von Acetylcholin nach Vorbehandlung mit Atropin 10^{-9} : normale Erregungsreaktion. — Ausgezogene Linie = Sauerstoffverbrauch; gestrichelte Linie = CO_2 -Bildung; schraffiertes Feld = „Extraktkohlsäure“-Bildung. Ordinatewerte in $Q = \mu\text{l}$ Gas pro Stunde und mg Trockensubstanz. Atropin wurde der RINGER-Lösung im Versuchsgefäß zu Beginn des Versuchs zugesetzt, Acetylcholin während des Versuches aus der Anhangsbirne eingekippt. $A \uparrow$ = Zusatz von Acetylcholin 4×10^{-7} .

Die angegebenen Dosen beziehen sich stets auf die Endkonzentration.

3. Papaverin.

Papaverin wurde als Hydrochlorid unter Erwärmen in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und in analoger Weise geprüft. Bis zu einer Konzentration von 10^{-6} wurde der Ruhestoffwechsel nicht beeinflusst. Bei weiterer Steigerung der Konzentration über 4×10^{-6} hinaus trat aber schon eine charakteristische Änderung des Stoffwechseltyps in Erscheinung: die Atmung wurde kurzfristig gesteigert, anschließend jedoch erheblich gesenkt; gleichzeitig setzte eine starke aerobe Glykolyse ein, die meist über längere Zeit bestehen blieb und erst im Verlauf von einigen Stunden allmählich wieder zurückging. Dies Verhalten des Stoffwechsels

ist außerordentlich charakteristisch für unspezifische Schädigungen des Gewebes¹⁴. Papaverin wirkt also schon in einer Konzentration von 4×10^{-6} gewebsschädigend. Bei einer Konzentration von 10^{-5} , die etwa der DE_{95} (BROCK u. Mitarb.¹¹) am glattmuskulären isolierten Organ entspricht, waren die Zeichen der Schädigung noch vermehrt, zumeist trat eine Erholung überhaupt nicht mehr ein. Papaverin hat also in diesen Konzentrationen eine erhebliche zell- und gewebsschädigende Wirkung.

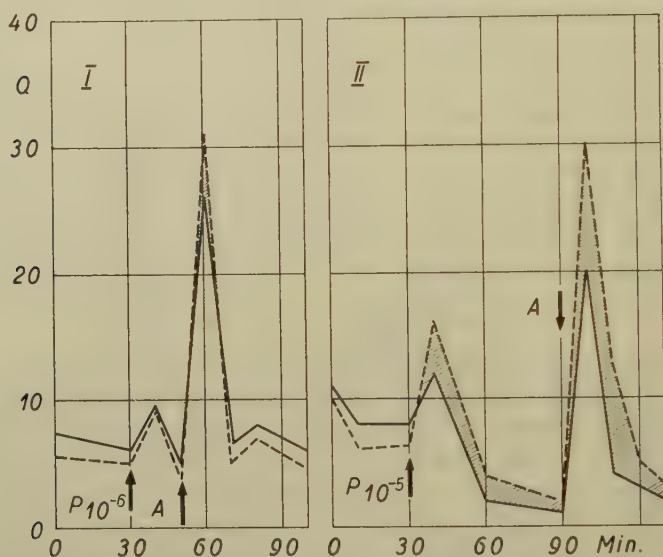


Abb. 2. Wirkung von Papaverin auf Grund- und Erregungsstoffwechsel von Speicheldrüsen-schnitten. Kurve I. Papaverin (10^{-6}) hemmt die Auslösung eines Erregungsstoffwechsels durch Acetylcholin (5×10^{-7}) nicht. Kurve II. Papaverin (10^{-5}) löst einen „Schädigungsstoffwechsel“ (aerobe Glykolyse mit folgendem Anstieg und Abfall der Atmung) aus, ohne die Erregbarkeit der Drüse für Acetylcholin aufzuheben. P $\uparrow$ = Zusatz von Papaverin.

Allgemeine Erklärungen vgl. Abb. 1.

Trotz der im Stoffwechsel nachweisbaren sicheren Anzeichen einer schweren Schädigung war die Erregbarkeit des Gewebes auf Acetylcholin — selbst bei einer Papaverinkonzentration von 10^{-5} und 5×10^{-5} — anfangs noch erhalten (Abb. 2). Papaverin wirkt also im Stoffwechseltest — im Gegensatz zum glattmuskulären Organ — nicht als Antagonist des Acetylcholins. Es verhält sich damit völlig entgegengesetzt zum Atropin. Damit war hier die Ausgangslage für die geplanten Untersuchungen wesentlich klarer als am glattmuskulären Organ.

Auffallend ist die hohe Giftigkeit des Papaverins, die im Stoffwechseltest klar und frühzeitig erfaßt werden konnte. Papaverin zeigte sich hier als starkes Zellgift. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von

DRUCKREY, DANNEBERG u. SCHMÄHL am Seeigelei, an dem Papaverin sich mit einer DE_{50} von $6 \gamma/ml$ (6×10^{-6}) sogar als ein etwa 3fach stärkeres Zellteilungsgift erwies als Colchicin ($16 \gamma/ml$).

Berücksichtigt man die Tatsache, daß die wirksamen Konzentrationen sowohl im Stoffwechsel- als auch im Seeigelei- und Spasmolysetest in der gleichen Größenordnung (10^{-5}) gelegen sind, so ist die Annahme wohl naheliegend, auch der lähmenden Wirkung am glattmuskulären Organ einen mehr unspezifischen Charakter beizumessen.

Darüber hinaus stützen diese verschiedenen Befunde die Ansicht, daß „Papaverin doch recht toxisch sei“⁵, eine Ansicht, der auf Grund einer Letalitätsbestimmung (DL_{50}) widersprochen wurde²³. Abgesehen von der heute wohl allgemeinen Erkenntnis, daß man aus einer Bestimmung der letalen Dosis *allein* die therapeutische Breite einer Substanz nicht beurteilen kann¹⁰, beweist auch der vorliegende überraschende Befund im Stoffwechsel sowie die gleichlaufenden Beobachtungen am Seeigelei und im Spasmolysetest, daß sowohl die therapeutisch interessierende als auch die unerwünschte Wirkqualität von Papaverin eng zusammenliegen, die therapeutische Breite demnach nicht günstig zu beurteilen ist.

4. Pendiomid.

Pendiomid wurde zu Versuchszwecken aus der 5% igen Ampullenlösung entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Nachdem wir in Vorversuchen festgestellt hatten, daß der Grundstoffwechsel bis zu einer Konzentration von 10^{-3} nicht beeinflusst wurde, prüften wir die Wirksamkeit der Substanz auf die Auslösbarkeit des Erregungsstoffwechsels nach Acetylcholin. Selbst in der hohen Konzentration von 10^{-4} war Pendiomid nicht in der Lage, den Erregungsstoffwechsel zu unterbinden. Die Ausschläge waren zwar erheblich reduziert, der Typ der Reaktion jedoch voll erhalten. Bei weiterer Steigerung der Pendiomidkonzentration auf 10^{-3} war die Erregungsreaktion gestört, es kam nur zu einer gewissen Atemsteigerung, eine aerobe Glykolyse war dagegen nicht zu beobachten. Angesichts der hohen Konzentration von 10^{-3} ist dieser Effekt nicht mehr im Sinne einer spezifischen anticholinergischen Wirksamkeit zu verwerten. Pendiomid als Typ des „echten“ Ganglienblockers ist also an den cholinergischen Nervenendigungen praktisch wirkungslos. Diese Ergebnisse stehen in bester Übereinstimmung mit den Befunden von BEIN u. Mitarb.

Analoge Resultate haben wir auch mit Nicotin und Tetraäthylammonium erhalten. Beide Substanzen zeigten im Stoffwechseltest bis zu einer Konzentration von 10^{-4} keinerlei Hemmwirkung gegenüber Acetylcholin.

5. d-Tubocurarin.

Applikation von d-Tubocurarin* blieb in einem Konzentrationsbereich von 10^{-3} bis 10^{-7} ebenfalls ohne Einfluß auf den Ruhe- und Erregungsstoffwechsel. Dieses Ergebnis entspricht der allgemeinen

* Curarin-ASTA.

Anschauung, daß der spezifische Antagonismus curareartiger Muskelrelaxantien gegenüber Acetylcholin weitgehend auf die motorische Endplatte der quergestreiften Muskulatur beschränkt ist.

6. Prüfung verschiedener vegetativer Pharmaka und Spasmolytica im „Stoffwechseltest“.

In den bisherigen Versuchen konnte der Nachweis erbracht werden, daß der „Stoffwechseltest“ an der Speicheldrüse zur eindeutigen Charakterisierung der peripheren parasymphathicolytischen Wirkkomponente

Tabelle 2. Wirkung verschiedener vegetativer Pharmaka bzw. Spasmolytica auf den durch Acetylcholin ausgelösten Erregungsstoffwechsel der Speicheldrüse.

Gruppe	Substanz	Wirksame Grenzkonzentration zur Aufhebung der Wirkung von Acetylcholin ($5 \cdot 10^{-7}$)
I Natürliche Alkaloide	Atropinsulfat	wirksam bis 10^{-8}
	Scopolamin-hydrobromid	wirksam bis 10^{-8}
II Parasympathico- lytika: Anticholinergica mit quartärem Stickstoff	Brommethylat des Phenyl-cyclohexyl- oxy-essigsäure-diäthylaminoäthylesters (ANTRENYL-E.W.Z. Ciba AG.)	wirksam bis 10^{-8}
	Brommethylat des β -Diäthyl-amino- äthyl-xanthen-9-carbonsäureesters (METHANTHELIN)	wirksam bis 10^{-8}
	Scopolamin-N-butylbromid	wirksam bis 10^{-6}
	Hydrochlorid des α -[N-(β -Diäthyl- aminoäthyl)]-aminophenylessigsäure- isoamylesters (AVACAN-E.W.Z. Asta-Werke AG.)	wirksam 2×10^{-7}
III Parasympathico- lytika: Anticholin- ergica mit tertiärem Stickstoff	Hydrochlorid des Phenyleyclohexyl- essigsäure-diäthylaminoäthylesters (TRASENTIN-E.W.Z. Ciba AG.)	wirksam bis 10^{-6}
	Hydrochlorid des α -n-Propyl-phenyl- essigsäure-diäthylaminoäthylesters (PROPIVANE-E.W.Z. Specia)	wirksam bis 10^{-5}
	Phosphat des Tropasäure-diäthylamino- 2,2-dimethylpropylesters (SYNTRO- PAN-E.W.Z. Hoffmann-La Roche AG.)	wirksam bis 10^{-5}
	Morphin-hydrochlorid	negativ bis 10^{-4}
IV Zentrale Analgetica	Hydrochlorid des 1-Methyl-4-phenyl- piperidin-4-carbonsäure-äthylesters (DOLANTIN-E.W.Z. Farb. Hoechst)	wirksam bis 10^{-5}
	Hydrochlorid des 2-Dimethylamino- 4,4'-diphenyl-heptanon (5) POLA- MIDON-E.W.Z. Farb. Hoechst)	negativ bis 10^{-4}

Tabelle 2. (Fortsetzung.)

Gruppe	Substanz	Wirksame Grenzkonzentration zur Aufhebung der Wirkung von Acetylcholin (5×10^{-7})
V Echte Ganglienblocker	Nicotin	neg. bis 2×10^{-5}
	Dibromid des N,N,N',N'-3-pentamethyl- N,N'-diäthyl-3-aza-pentyl-(1,5)- diammonium (PENDIOMID-E.W.Z. Ciba AG.)	negativ bis 10^{-4}
	Tetraäthyl-Ammonium-Bromid	negativ bis 10^{-4}
VI Myotrope Spasmolytica und andere Pharmaka	Papaverin-hydrochlorid	negativ bis 5×10^{-5}
	Hydrochlorid des 1-Benzyl-3-äthyl- 6,7-dimethoxy-isochinolins (EUPAVERIN-E.W.Z. E. Merck)	negativ bis 5×10^{-5}
	Hydrochlorid des 6,7-diäthoxy-1- (3,4-diäthoxy-benzyl)-isochinolins (BARBONIN-E.W.Z. Knoll AG.)	negativ bis 5×10^{-5}
	Isoamylamino-methylheptan (OCTINUM „D“-E.W.Z. Knoll AG.)	negativ bis 5×10^{-5}
	Diphenylpropyl-äthylamin (SESTRON-E.W.Z. Promonta GmbH)	wirksam bis 10^{-5}
	5,8-Dimethoxy-2-methylfurano- (4',5':6,7)-chromon (KHELLIN)	negativ bis 10^{-4}
	Nicotinylamino-1,2-diphenyläthan (LYSPASMIN-E.W.Z. Cilag GmbH)	negativ bis 10^{-4}
	Diäthylaminoäthanol	negativ bis 10^{-4}

geeignet ist. Nachdem damit eine klare Grundlage geschaffen war, prüften wir eine größere Anzahl von verschiedenartigen vegetativen Pharmaka und Spasmolytica unter den eingangs erörterten Gesichtspunkten, um festzustellen, inwieweit ihre Wirkung auf einem anticholinergischen Effekt beruhen kann. Da die Methode stets dieselbe war wie in den bereits geschilderten Versuchen, können wir uns darauf beschränken, die wesentlichen Ergebnisse in Form einer Tabelle zusammenzufassen (Tab. 2). Über einige Resultate wurde bereits kurz berichtet⁶.

In der ersten Gruppe bewies neben Atropin auch Scopolamin eine hohe parasymphathicolytische Wirksamkeit, die quantitativ mit den an isolierten muskulären Organen, z. B. am Meerschweinchenileum ermittelten Werten übereinstimmte. Ein analoges Verhalten zeigten auch die Substanzen der zweiten Gruppe: Antrenyl und Methanthelin gehören mit einer wirksamen Grenzkonzentration von 10^{-8} zu den parasymphathicolytisch stärkst wirksamen Pharmaka überhaupt. Das Scopolamin-

N-butylbromid war mit einer wirksamen Grenzkonzentration von 10^{-6} zwar wesentlich schwächer aktiv als Scopolamin, erwies sich aber immer noch als eine Substanz von hoher parasymphaticolytischer Wirkung (Abb. 3, I). Die „echten“ Ganglienblocker (Gruppe V) ließen dagegen selbst in der hohen Konzentration von 10^{-4} keinen Antagonismus gegen die periphere Wirkung des Acetylcholins erkennen; ihre Wirksamkeit

ist somit offenbar auf die Aufhebung der Reizübertragung in den Ganglien selbst beschränkt.

Damit ist die eingangs aufgeworfene Frage, ob die Umwandlung eines Parasympathicolyticums mit tertiärem Stickstoff in die entsprechende quartäre Base zu einer grundsätzlichen Veränderung ihrer Wirkung, speziell ob sie zu einem Verlust ihrer spezifischen parasymphaticolytischen Wirkkomponente führen muß oder nicht, eindeutig geklärt. Die Umwandlung einer solchen „tertiären“ Base in die quartäre Form hebt die parasymphaticolytische Wirksamkeit nicht auf, sondern vermag nur u. U. die In-

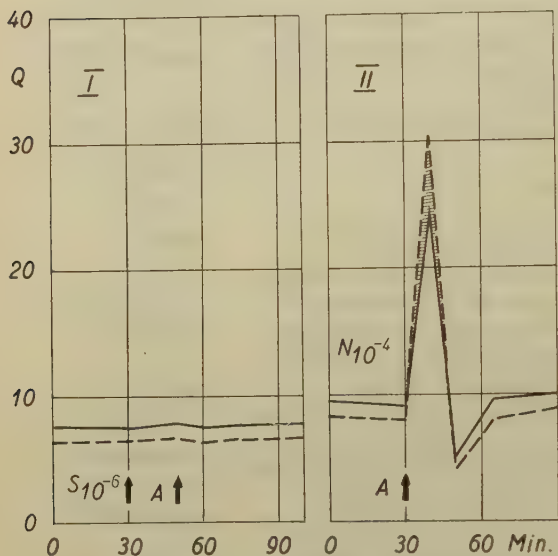


Abb. 3. Wirkung von Scopolamin-N-butylbromid und Nicotylamino-1,2-diphenyläthan auf den Grund- und Erregungsstoffwechsel von Speicheldrüsen. Kurve I. Nach Vorbehandlung mit Scopolamin-N-butylbromid (10^{-6}) ist ein Erregungsstoffwechsel durch Acetylcholin nicht mehr auslösbar. $S \uparrow$ = Scopolamin-N-butylbromid. $A \uparrow$ = Acetylcholin 5×10^{-7} . Kurve II. Nicotylamino-1,2-diphenyläthan (GORDONOFF) hemmt die Auslösung eines Erregungsstoffwechsels durch Acetylcholin nicht. N = Nicotylamino-1,2-diphenyläthan (im Versuchsgefäß). $A \uparrow$ = Acetylcholin 5×10^{-7} . Allgemeine Erklärungen vgl. Abb. 1.

tensität dieser Wirkung zu beeinflussen. Grundsätzlich bleiben aber die Substanzen — ob mit tertiärem oder quartärem Stickstoffatom — hochwirksame Anticholinergika. Die weitere Frage, ob die erwähnten quartären Verbindungen darüber hinaus noch eine ganglienblockierende Wirkung besitzen und welche praktische Bedeutung derselben gegebenenfalls zuzumessen ist, kann durch unsere Versuche an der isolierten Speicheldrüse naturgemäß nicht beurteilt werden. Das ist aber durch die umfassenden Untersuchungen von BEIN u. Mitarb. bereits entschieden worden. Auf Grund ihrer Ergebnisse sowie dem in dieser Arbeit auch am drüsigen Organ geführten Nachweis ihrer starken parasym-

pathicolytischen Wirkung erscheint es nicht gerechtfertigt, diese quartären Basen einseitig in die Reihe der „echten“ Ganglienblocker zu stellen. Vielmehr sollte die bei ihnen nachgewiesene parasympathicolytische Wirkung, die für die Therapie doch besonders wichtig ist, auch ihre pharmakologische Einordnung und ebenso die Nomenklatur zumindest mitbestimmen.

Wenn die bei solchen quartären Basen beobachtete, aber doch nur relativ schwach ausgebildete ganglienblockierende Wirkkomponente auch in der Nomenklatur zum Ausdruck gebracht werden soll, so könnte man diese Pharmaka etwa als „Anticholinergica mit ganglienblockierenden Eigenschaften“ charakterisieren. Das setzt jedoch den Nachweis voraus, daß die ganglienblockierende Wirkqualität nicht nur vorhanden ist, sondern *auch im therapeutischen Dosenbereich* tatsächlich eine Bedeutung hat.

Von den synthetischen Pharmaka mit tertiärem Stickstoff (Gruppe 3) hatten Avacan (2×10^{-7}) und Trasentin (10^{-6}) eine kräftige parasympathicolytische Wirksamkeit. Auch Propivan und Syntropan (10^{-5}) waren noch sicher wirksam. Da die 3 Erstgenannten am glattmuskulären Organ im Bereich therapeutischer Dosen außerdem auch „myotrop“ wirksam sind, bedeutet dieser Nachweis die Bestätigung, daß es sich bei Avacan, Trasentin und Propivan um Spasmolytika mit kombinierter — anticholinergischer und muscilotroper — Wirkung handelt.

Die „myotropen“ Spasmolytica der Gruppe VI waren — mit Ausnahme des Diphenylpropyl-methylamins — anticholinergisch *nicht* wirksam. Für die Substanzen, die sich chemisch vom Papaverin ableiten, ist dies bereits an anderen Objekten bekannt. Unsere Ergebnisse bedeuten also nur eine Bestätigung dieser Erfahrungen an einem drüsigen Organ. Nicotinylamino-1,2-diphenyläthan (GORDONOFF) war selbst in der hohen Konzentration von 10^{-4} ohne jede Wirkung auf den Erregungsstoffwechsel (Abb. 3, II).

Interessant waren die Befunde mit einigen zentralen Analgetica (Gruppe IV). Von den untersuchten Substanzen war nämlich nur *Dolantin* in der Lage, die Auslösung des Erregungsstoffwechsels durch Acetylcholin zu verhindern (wirksame Grenzkonzentration 10^{-5}). Die Auffassung von SCHAUMANN, daß *Dolantin* nicht nur ein zentrales Analgeticum, sondern auch ein Spasmolyticum mit kombinierter Wirkung sei, ließ sich also auch am drüsigen Objekt sicherstellen. Morphin und Polamidon hatten dagegen auch in 5fach höherer Konzentration keine Wirkung sowohl am Ruhestoffwechsel als auch am Erregungsstoffwechsel.

Im ganzen zeigen unsere Versuche, daß ein drüsiges Organ als Testobjekt für das Studium der Wirkung von „vegetativen Pharmaka“ manche Vorteile gegenüber muskulären Organen haben kann, weil hier unspezifische Wirkungen auf die contractile Substanz nicht stören können; allerdings ist die Methode schwieriger.

Zusammenfassung.

Zum Nachweis spezifisch anticholinergischer Wirkungen hat sich der „Stoffwechseltest“ an Gewebsschnitten der Speicheldrüse (Katze) als besonders geeignet erwiesen. Grundlage desselben ist der „Erregungsstoffwechsel“, der durch cholinergische Pharmaka ausgelöst und durch anticholinergische Substanzen spezifisch gehemmt wird. Die im Stoffwechseltest wirksamen Konzentrationen stimmen gut mit den am isolierten glattmuskulären Organ wirksam überein. Im einzelnen wurden folgende Befunde erhoben:

1. Atropin und Scopolamin erwiesen sich als spezifische Anticholinergika, ihre wirksame Grenzkonzentration lag bei 10^{-8} .

2. Papaverin war bis zu einer Konzentration von 5×10^{-5} ohne Wirkung auf den Erregungsstoffwechsel. Dagegen waren im Grundstoffwechsel bereits bei einer Konzentration von 5×10^{-6} die Zeichen einer ausgesprochenen Zellschädigung nachweisbar („Schädigungsstoffwechsel“).

3. Die sogenannten Ganglienblocker Nicotin, Pendiomid und Tetraäthylammoniumbromid zeigten an Gewebsschnitten der Speicheldrüse keine anticholinergische Wirksamkeit.

4. d-Tubocurarin war wirkungslos.

5. Aus der Reihe der Spasmolytica mit tertiärem Stickstoff führten Avacan, Trasentin und Propivan zu einer spezifischen Hemmung des Erregungsstoffwechsels. Die wirksamen Grenzkonzentrationen lagen bei 2×10^{-7} , 10^{-6} bzw. 10^{-5} . Die genannten Substanzen sind mit Recht als Spasmolytica mit kombinierter — anticholinergischer und myotroper — Wirksamkeit zu bezeichnen.

6. Aus der Reihe der Spasmolytica mit quartärem Stickstoff bewiesen Antrenyl, Methanthelin und auch Scopolamin-N-butylbromid eine hohe anticholinergische Wirksamkeit. Ihre wirksamen Grenzkonzentrationen lagen bei 10^{-8} , 10^{-8} bzw. 10^{-6} . Die Überführung des tertiären Stickstoffs in die quartäre Form ist demnach nicht in der Lage, den Wirkungscharakter von typischen Anticholinergica zu ändern; auch die quartären Produkte sind typische Anticholinergica geblieben. Die einseitige Einordnung dieser Substanzen in die Gruppe der echten Ganglienblocker ist auf Grund der vorliegenden Erkenntnisse nicht gerechtfertigt.

7. Unter den geprüften zentralen Analgetica besaß nur Dolantin eine spezifische anticholinergische Wirksamkeit, Morphin und Polamidon dagegen nicht.

Literatur.

- ¹ BEIN, H. J.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **1951**, 196. — ² BEIN, H. J., F. GROSS, W. SCHULER u. J. TRIPOD: Schweiz. med. Wschr. **1952**, 1143. — ³ BERNSTEIN, A., H. ESSER u. W. LORENZ: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 452. — ⁴ BROCK, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **198**, 609 (1941). — ⁵ BROCK, N.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 474. — ⁶ BROCK, N.: Dtsch. Apotheker-Ztg. **1952**, 242. — ⁷ BROCK,

N., u. H. DRUCKREY: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **198**, 644 (1941). —⁸ BROCK, N., H. DRUCKREY u. H. HERKEN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **191**, 687 (1938). —⁹ BROCK, N., H. DRUCKREY u. H. HERKEN: Biochem. Z. **300**, 1 (1938). —¹⁰ BROCK, N., u. F. J. GEKS: Naturwissenschaften **38**, 351 (1951). —¹¹ BROCK, N., F. J. GEKS u. D. LORENZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 492 (1952). —¹² BROICHER, H.: Klin. Wschr. **1953**, 890. —¹³ CORSEN, G.: Med. Klin. **1953**, 1286. —¹⁴ DRUCKREY, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **180**, 231 (1936). —¹⁵ DRUCKREY, H., P. DANNEBERG u. D. SCHMÄHL: Arzneimittel-Forsch. **3**, 151 (1953). —¹⁶ GILLIGSBERGER, F., u. W. KERSCHNER: Wien. med. Wschr. **1953**, 469. —¹⁷ GORDONOFF, T.: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 855. —¹⁸ KERN, E.: Anaesthesist (Berlin) **1**, 15 (1952). —¹⁹ KLIMKE, W.: Med. Klin. **1953**, 369. —²⁰ ORZECOWSKI, G.: Ther. Gegenw. **1953**, 421. —²¹ RICHTER, I.: Ärztl. Wschr. **1953**, 1203. —²² SCHAUMANN, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **196**, 109 (1940). —²³ SCHMIDT, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **216**, 178 (1952). —²⁴ WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926. —²⁵ WICK, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 485 (1951).

Doz. Dr. N. BROCK, Pharmacol. Abteilung der Asta-Werke A.G.,
Chemische Fabrik, Brackwede/Westf.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i.W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. LOESER).

Über die Wirkung von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol auf glattnuskuläre Organe.

Von

HERMANN-JOSEF LEPELTMANN und ARNOLD LOESER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Juni 1954.)

Durch Substitution von 1,3-Butandiol zu 2-Äthyl-1,3-Pentandiol entsteht eine Verbindung, die zwar chemisch ebenfalls den zweiwertigen Alkoholen zuzurechnen ist, sich aber toxikologisch und pharmakologisch von der Muttersubstanz 1,3-Butandiol erheblich unterscheidet. Diese Unterschiede ergeben sich aus vergleichenden Untersuchungen der Toxizität, des Blutdruckes sowie aus dem Verhalten der glatten Muskulatur von Bronchien, Darm und Uterus nach Einwirkung von 1,3-Butandiol bzw. 2-Äthyl-1,3-Pentandiol.

2-Äthyl-1,3-Pentandiol¹ ($C_7H_{16}O_2$; Molgewicht 132) ist in reinem Zustand eine klare, farb- und beinahe geruchlose Flüssigkeit, für die folgende Konstanten angegeben werden: Kp_2 110° C; Dichte 0,944; Brechungsindex 1,4493; Hydroxylzahl 831.

Methodisches.

Die Wirkung auf den Blutdruck wurde an Katzen in Chloralose/Urethan-Narkose — 0,05 g/0,5 g je Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal — untersucht (Art. carotis; Hg-Manometer; Applikation der Prüfsubstanzen in die freigelegte V. femoralis).

Die Prüfung auf broncholytische bzw. bronchospastische Wirksamkeit erfolgte nach der Methode von KONZETT u. RÖSSLER. Versuchstiere waren Hunde und Katzen. Die Katzen wurden in der vorstehend angegebenen Weise, die Hunde mit Morphin/Chloralose — 0,0025 g s.c./0,1 g i.v. je Kilogramm Körpergewicht — narkotisiert. Den Blutdruck registrierten wir zusätzlich mit einem Hg-Manometer in der A. carotis. Während der ganzen Versuchsdauer wurde die Körpertemperatur der Tiere auf 38° C konstant gehalten. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in die V. femoralis injiziert oder als Nebel (Aerosol-Inhalator, Mod. MK 1 Nr. 600 DRÄGER) auf dem Wege über die STARLING-Pumpe (Beatmungsfrequenz für Hunde 20, für Katzen 28/min; Beatmungsdruck — Wasserhöhe in der Waschflasche — für Hunde 12 cm H_2O , für Katzen 9 cm H_2O) unmittelbar in die Atemwege eingebracht.

Den für Vergleichszwecke erforderlichen Bronchospasmus erzeugten wir durch intravenöse Dauerinfusion von Histaminbiphosphat (Infusionsapparatur nach

¹ Für die Überlassung der Substanz sei auch an dieser Stelle den Chemischen Werken Hüls gedankt.

STRAUB; Hunde: 1—4 γ /kg/min) bzw. durch Einatmung eines Nebels, der aus einer Histaminbiphosphatlösung 1:10000 bis 1:5000 bereitet war.

Das Verhalten von Darm (Jejunum) bzw. Uterus der Ratte und des Meerschweinchens wurde in der Anordnung von MAGNUS bzw. MAGNUS-KEHRER geprüft (Organbad: 40 cm³, Tyrode-Lösung; für die Darmversuche mit Zusatz von 1 g Glucose pro Liter). Die frisch entnommenen, 2—3 cm langen Organstücke wurden vor dem Versuch für 1 Std bei 4° C aufbewahrt.

Bei Versuchen am Meerschweinchendarm in der Anordnung von STRAUB u. VIAUD wurden die Prüfsubstanzen enteral (durch eine im Duodenum oder in dem abgebundenen Darmstück selbst liegende Kanüle) bzw. intraperitoneal (Modifikation der STRAUBSchen Methode nach BIEHLER) appliziert.

Ausführung der Untersuchungen: Januar bis Mai 1954.

Ergebnisse.

1. *Toxicität.* Vergleicht man die aus früheren Versuchen bekannte mittlere tödliche Dosis (LD 50) von 1,3-Butandiol mit der von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol, so ergibt sich, daß das Substitutionsprodukt 2-Äthyl-1,3-Pentandiol annähernd 4mal toxischer ist als die Ausgangssubstanz 1,3-Butandiol. Die mittleren tödlichen Dosen (LD 50, 24 Std) nach KÄRBER, berechnet nach BURN, sind in Tab. 1 gegenübergestellt.

Die Vergiftungserscheinungen nach oraler Zufuhr von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol entsprechen bei Mäusen und Ratten weitgehend den Veränderungen, welche bei Anwendung von tödlichen Mengen des zweiwertigen Alkohols 1,3-Butandiol zu beobachten sind: es kommt zur Narkose, die Reflexe schwinden, und die Tiere gehen an Atemlähmung zugrunde. Bei Mäusen kann vor dem Tode noch ein Excitationsstadium auftreten.

Tabelle 1.

Vergleich der *Toxicität* von 1,3-Butandiol und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol bei der Maus (cm³ pro kg, 24 Std, per os).

Substanz	Konstitution	LD 50
1,3-Butandiol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$	23,3
2-Äthyl-1,3-Pentandiol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \text{C}_2\text{H}_5 \qquad \text{OH} \end{array}$	6,3

2. *Blutdruck.* Die Wirkung von 1,3-Butandiol und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol auf den Blutdruck wurde an 2 Katzen im Gewicht von je 2,5 kg untersucht. 1 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butandiol (Verdünnungsmittel: physiologische NaCl-Lösung) i.v. führte zu einem $\frac{1}{2}$ —1 min andauernden Blutdruckabfall um 20—25 mm Hg. Demgegenüber bewirkte bereits 0,5 cm³ einer 12,5%igen wäßrigen 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Lösung am gleichen Tier eine Senkung des arteriellen Druckes um 40—45 mm Hg, die etwa 1—1 $\frac{1}{2}$ min anhielt. Dieser Effekt ließ sich beliebig oft wiederholen.

3. *Bronchialmuskulatur.* Bei 4 Hunden und 3 Katzen wurde die normale Bronchialmuskulatur durch Inhalation von Nebel, der aus 10 bis 50% igen wäßrigen Lösungen von 1,3-Butandiol hergestellt war, nicht beeinflusst, weder im Sinne einer Erschlaffung noch eines Spasmus. Während einer Inhalationsdauer bis zu 7 min bleiben Lungenvolumen und Blutdruck völlig unverändert.

Im Gegensatz dazu führte die Einatmung eines 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Nebels bei denselben Tieren (4 Hunden und 2 der untersuchten 3 Katzen) zu einem kräftigen Bronchospasmus, der gewöhnlich 1 bis $1\frac{1}{2}$ min nach Beginn der Inhalation einsetzte (siehe Abb. 1). Die wirk-same Konzentration der vernebelten wäßrigen Lösungen betrug 2,5% bis 50%, im Durchschnitt 20%. Höher konzentrierte Lösungen wurden wegen der verhältnismäßig großen Viscosität von 1,3-Butandiol und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol nicht vernebelt.

Die Dauer des Bronchospasmus war bei den einzelnen Tieren weitgehend abhängig von der Konzentration des Nebels. So bewirkte die jeweils $1\frac{1}{2}$ min dauernde Beatmung einer 2,4 kg schweren Katze mit einem Nebel aus einer 6,25% igen, 12,5% igen oder 25% igen wäßrigen Lösung von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol eine fast proportionale Verstärkung des Bronchospasmus; nach jeweils 2, 6 und 11 min waren die Veränderungen abgeklungen und die normale Ausgangslage wieder erreicht.

Bei i.v. Dauerinfusion von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol (bis zu 10 mg/kg/min) ließ sich bei der Katze kein Bronchospasmus erzeugen. Es kam lediglich zu einem anhaltenden Abfall des gleichzeitig registrierten Blutdruckes.

Wird 2-Äthyl-1,3-Pentandiol hingegen in Nebelform zugeführt, so bleibt der Blutdruck von Hund und Katze fast immer unverändert, selbst wenn die Inhalation für die Dauer von 15—20 min mit einem Nebel aus einer 30% igen wäßrigen 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Lösung ausgeführt wird.

Wie weitere Versuche ergaben, kann die nach Einatmung von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol einsetzende Bronchokonstriktion durch verschiedene broncholytisch wirkende Substanzen ebenso aufgehoben werden wie ein zu Vergleichszwecken durch Inhalation von Histamin-Nebel erzeugter Bronchospasmus. So führte die i.v. Injektion von Adrenalin (Hund: 2 γ /kg, Katze: 30 γ /kg) beim 2-Äthyl-1,3-Pentandiol- und auch beim Histamin-Bronchospasmus zu einer prompten, 3—6 min anhaltenden und die Blutdruckwirkung überdauernden Broncholyse, d. h. einer Rückkehr des Atemvolumens zur Norm (Abb. 1). — Atropin (Hund: 6 mg/kg i.v.) vermochte den Eintritt des Bronchospasmus nach Inhalation weder von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol noch von Histamin zu verhindern. Beide Arten von Spasmen ließen sich *vor* der Atropingabe einwandfrei

erzeugen. — Nach i.v. Injektion von Eupaverin (10—15 mg/kg Hund) blieben sowohl der 2-Äthyl-1,3-Pentandiol- als auch der Histamin-Bronchospasmus aus. Vorher war ebenfalls die Reaktion des Tieres auf diese beiden Substanzen geprüft worden. — Avil¹ (p-aminosalicylsaures 1-Phenyl-1-pyridyl(2')-3-dimethylaminopropan, 8 mg/kg i.v.) unter-

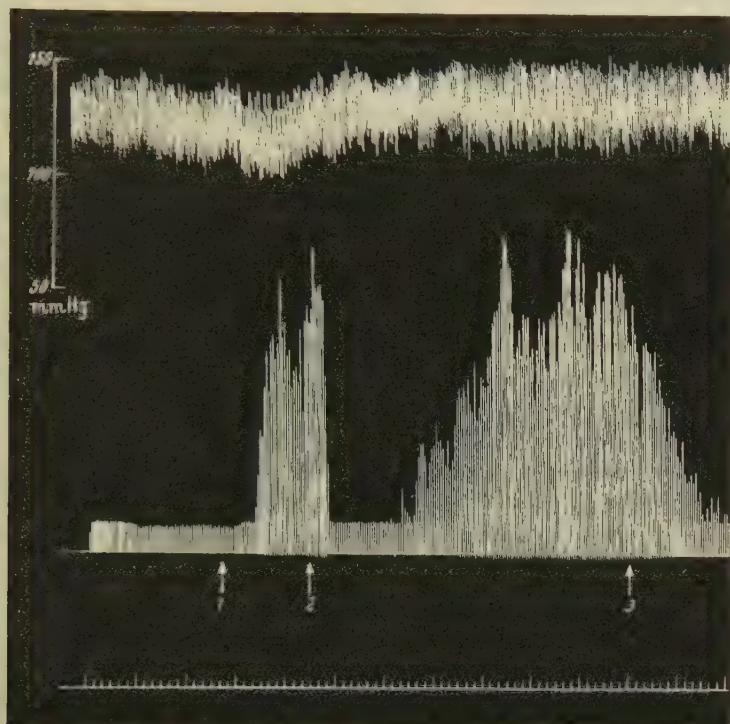


Abb. 1. ♂ Hund, 6 kg. Spastische Kontraktion der Bronchialmuskulatur bei Einwirkung eines Nebels aus 2-Äthyl-1,3-Pentandiol (2,5% ige wäßrige Lösung). Von oben nach unten: Blutdruck; das von der Lunge nicht aufgenommene Atemvolumen; Zeit: 10 sec. Von $\uparrow_1$ — $\uparrow_3$ Nebelinhala-
tion. Bei $\uparrow_2$ i.v. Injektion von 2 γ /kg Adrenalin. Man beachte die vorübergehende Lösung des Spasmus.

drückte beim Hund zwar den Histamin-Bronchospasmus, ließ jedoch den 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Spasmus unverändert. — Beidseitige Vagusdurchtrennung beim Hund hatte weder auf den 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Spasmus noch auf den des Histamins einen Einfluß.

Die verschiedene Wirkung von 1,3-Butandiol und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol auf die glatte Muskulatur der Bronchien geht auch aus Untersuchungen an Hunden hervor, bei denen durch i.v. Dauerinfusion von Histamin ein Bronchospasmus erzeugt worden war. Wurden diese Tiere

¹ Avil „Hoechst“.

mit einem Nebel beatmet, der aus einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butandiol bereitet war, so blieb der durch Histamin bedingte Bronchospasmus unbeeinflusst. Er wurde aber sofort verstärkt, wenn Nebel zugeführt wurde, der aus einer 12,5%igen wäßrigen Lösung von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol hergestellt war.

4. *Darm.* Auf das isolierte Jejunum der *Ratte* hatte 1,3-Butandiol in einer Konzentration von 1:1000 entweder keinen Einfluß oder führte zu einer nur leichten Tonussenkung bei Erhaltenbleiben der normalen Kontraktionen. 2-Äthyl-1,3-Pentandiol in der gleichen Konzentration bewirkte bei 25 von 33 untersuchten Präparaten nach regelmäßig vorangehender kurzer Tonussenkung einen Spasmus des Darmes. Die rhythmischen Bewegungen waren dabei meistens völlig aufgehoben. Bei den restlichen 8 Präparaten ließ 2-Äthyl-1,3-Pentandiol 1:1000 in 6 Fällen keine Wirkung erkennen, in 2 Fällen kam es zu einer Tonussenkung.

Der durch 2-Äthyl-1,3-Pentandiol ausgelöste Spasmus ließ sich durch Adrenalin (1:40 Mill. bis 1:20 Mill.) und Eupaverin (1:100000), aber nicht durch Atropin (1:10000 bis 1:5000) aufheben. In der gleichen Weise verhielt sich der zu Vergleichszwecken herangezogene BaCl_2 -Spasmus des Darmes (Konzentration 1:10000).

Auf das isolierte Jejunum von *Meerschweinchen* hatten 1,3-Butandiol 1:1000 und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol 1:1000 keinen Einfluß. Ebenso wenig konnte am Meerschweinchen-Jejunum in der Anordnung nach STRAUB durch 2-Äthyl-1,3-Pentandiol (1:1000 bis 1:5), weder bei enteraler noch bei intraperitonealer Zufuhr, eine erregende Wirkung auf die Darmmuskulatur nachgewiesen werden.

5. *Uterus.* Tonus und Spontanbewegungen des isolierten *Ratten-uterus* bleiben bei Einwirkung von 1,3-Butandiol 1:1000 unverändert. 2-Äthyl-1,3-Pentandiol in der gleichen Konzentration führte bei 8 von 10 untersuchten Präparaten zu einer erheblichen Steigerung des Tonus bei Erhaltenbleiben der rhythmischen Kontraktionen. In einem der genannten Fälle traten erst nach Zusatz von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol rhythmische Bewegungen ein. Die restlichen Präparate zeigten keine Änderung der Uterusmotilität. Die durch 2-Äthyl-1,3-Pentandiol bedingte Tonussteigerung des Rattenuterus wurde durch Adrenalin (1:40 Mill. bis 1:20 Mill.) und Eupaverin (1:100000), nicht aber durch Atropin (1:10000 bis 1:5000) aufgehoben.

Am isolierten Uterus des virginellen *Meerschweinchens* ließ sich nach Zusatz von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol 1:1000 zur Badflüssigkeit keine Steigerung der Erregbarkeit nachweisen, obwohl die Präparate auf BaCl_2 1:10000 und Hypophysin $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{3}$ iE/40 cm³ Badflüssigkeit gut reagierten.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Vergleichende Untersuchungen über die pharmakologische Wirksamkeit von 1,3-Butandiol und 2-Äthyl-1,3-Pentandiol an der Bronchialmuskulatur des Hundes und der Katze in situ sowie am isolierten Darm und Uterus der Ratte ergaben eine weitgehende Indifferenz des 1,3-Butandiol an den untersuchten Organen. Diese Befunde stimmen mit den Angaben von LOESER u. Mitarb. (siehe auch BORNMAN, KOPF u. MEYER) überein. Im Gegensatz zum 1,3-Butandiol übte der ebenfalls zweiwertige Alkohol 2-Äthyl-1,3-Pentandiol eine erregende Wirkung auf die glatte Muskulatur aus.

Als Hinweis für den möglichen Angriffspunkt des 2-Äthyl-1,3-Pentandiol dürfen vielleicht folgende Beobachtungen gewertet werden: die Wirkungslosigkeit von Atropin bei prompter Spasmolyse durch Eupaverin, das analoge Verhalten des 2-Äthyl-1,3-Pentandiol-Spasmus zum Histamin-Bronchospasmus sowie zum BaCl_2 -Spasmus des Darmes. Der durch 2-Äthyl-1,3-Pentandiol ausgelöste Bronchospasmus bleibt nach beidseitiger Durchtrennung des N. vagus unverändert. Demnach scheint der Stoff direkt auf den Muskel einzuwirken.

Daß 2-Äthyl-1,3-Pentandiol bei seinem Angriff an der glatten Muskulatur im Gewebe gebundenes Histamin freisetzt, welches dann seinerseits einen Spasmus bewirkt, erscheint unwahrscheinlich. Avil verhindert beim Hund den Histamin-Bronchospasmus, nicht jedoch den Spasmus nach Inhalation von 2-Äthyl-1,3-Pentandiol. Die spastische Wirkung war nur an der glatten Muskulatur von Hund, Katze und Ratte zu beobachten, nicht beim Meerschweinchen.

Zusammenfassung.

1. 2-Äthyl-1,3-Pentandiol zeigt im Gegensatz zu 1,3-Butandiol eine erregende Wirkung auf die Bronchialmuskulatur von Hund und Katze in situ sowie auf den Darm und den Uterus der Ratte in vitro.

2. 2-Äthyl-1,3-Pentandiol scheint direkt am glatten Muskel anzugreifen.

Literatur.

BIEHLER, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **178**, 101 (1935). — BORNMAN, G., R. KOPF u. G. MEYER: Z. exper. Med. **116**, 87 (1950). — FISCHER, L., R. KOPF, A. LOESER u. G. MEYER: Z. exper. Med. **115**, 22 (1949). — KEHRER, E.: Arch. f. Gynäk. **81**, 160 (1907). — KONZETT, H., u. R. RÖSSLER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **195**, 71 (1940). — KOPF, R., A. LOESER u. G. MEYER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **210**, 346 (1950). — LOESER, A.: Die Pharmazie **4**, 263 (1949). — MAGNUS, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — STRAUB, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **185**, 456 (1937). — STRAUB, W., u. P. VIAUD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 1 (1933).

Prof. Dr. A. LOESER, Pharmacol. Inst. d. Universität Münster/Westf.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

Änderung der blutdrucksenkenden Wirkung von Apresolin und Nepresol durch Reaktion mit Serumbestandteilen.

Von

R. MEIER, J. TRIPOD und C. BRÜNL.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. April 1954.)

Die blutdrucksenkende Wirkung von Hydrazinophthalazinen wurde in unseren Laboratorien gefunden^{1, 2, 7, 8, 16}. Als Vertreter dieser Gruppe fanden Apresolin* und Nepresol**⁴ rasch interessante therapeutische Anwendung in der Behandlung der Hypertension⁶. Die ausführliche Literatur über experimentelle Untersuchungen findet sich in verschiedenen Arbeiten unserer Laboratorien^{2, 16}.

Hier sei nur zusammenfassend erwähnt, daß diese neuen Verbindungen schon bei 0,1—1,0 mg/kg intravenös eine eigenartige Blutdrucksenkung zu erzeugen vermögen, welche sich von den anderen bis jetzt bekannten Typen dadurch unterscheidet, daß sie relativ langsam auftritt, sehr lange dauert und einen gewissen Grad nicht überschreitet, sogar wenn die wirksame Dosis um ein Mehrfaches erhöht wird. Diese Blutdrucksenkung steht sicher in Zusammenhang mit peripheren Angriffspunkten, aber eine relativ enge Beziehung zu zentralgelegenen Kreislaufsteuerungen ist ebenfalls wahrscheinlich, da gewisse Kreislaufreflexe z. B. durch Apresolin beeinflusst werden.

Die eingehendere Analyse des Angriffspunktes dieser „antihypertensiven“ Pharmaka ergab eine besonders geartete periphere Wirkung, die vor allem durch bestimmte spezifische periphere Antagonismen am isolierten Warmblüterherzen und an den isoliert durchströmten Gefäßen, wie z. B. eine Coronarerweiterung, einen starken Antagonismus gegenüber BaCl₂, Pitressin und je nach dem Testorgan eine partielle Histaminolyse charakterisierbar ist. Eine ausgesprochene „sympathikolytische“ Wirkung ist nur partiell vorhanden, eine „parasymphathikomimetische“ Wirkung ist dagegen unwahrscheinlich^{2, 16}.

Der eigenartige Verlauf der Blutdruckwirkung bzw. die Besonderheiten dieser direkten bzw. antagonistischen Kreislaufwirkungen, wozu noch eine starke antidiuretische Wirkung von Apresolin und Nepresol¹⁶ und eine ausgesprochene Hemmung der Histaminase⁸ kommen, gab den Eindruck, daß ihr Wirkungsmechanismus kaum an den klassischen spezifischen neuro-vegetativen und histaminergischen Rezeptoren anzugreifen scheint, es sei denn, daß gewisse übergeordnete Receptorsysteme

* Chemische Bezeichnung: 1-Hydrazinophthalazin.

** Chemische Bezeichnung: 1, 4-Dihydrazinophthalazin.

die gleichzeitige Spezifität und Komplexität solcher Gefäßreaktionen in funktioneller oder in physikalisch-chemischer Hinsicht steuern und durch die erwähnten Stoffe in eigenartiger Weise beeinflußt werden¹⁶.

Da bekannt ist, daß Hydrazine chemisch in vielseitiger Hinsicht reaktionsfähige Substanzen sind, schien es uns angezeigt, mögliche Reaktionsteilnahmen in den „Geweben“ des tierischen Organismus zu suchen. Hierfür schien uns der Versuch geeignet, die blutdrucksenkende Wirkung dieser Stoffe durch Gewebsbestandteile, Metabolite und verschiedenartige hier in Frage kommende chemische Substanzen zu beeinflussen. In dieser Arbeit berichten wir über das Ergebnis der Beeinflussung der Kreislaufwirkung von Apresolin und Nepresol durch Vorbehandlung der Substanzen mit Blutserum oder mit Eiweißkörpern.

Methode.

Da die Wirkung der Hydrazine einerseits langsam eintritt und andererseits sehr lange dauert, schien sowohl für die Wirkung als für die Aufhebung der Wirkung ein Prozeß mit einem langen Zeitintervall in Frage zu kommen. Um diese Verhältnisse nachzuahmen, wurde Apresolin bzw. Nepresol mit Serum bis 48 Std im Brutschrank mit sterilen und nicht sterilen Serum- und Eiweißlösungen inkubiert und die Wirksamkeit der Lösung am Blutdruck mit derjenigen der Ausgangslösung und der Eiweißlösung verglichen.

Resultate.

In *Blutdruckversuchen* an Kaninchen (Narkose mit Urethan 1,2 g/kg s. c.) ergab sich, daß die Inkubation von Apresolin 5×10^{-4} in unverdünntem, normalem oder sterilem homologen *Plasma* während 20–24 Std

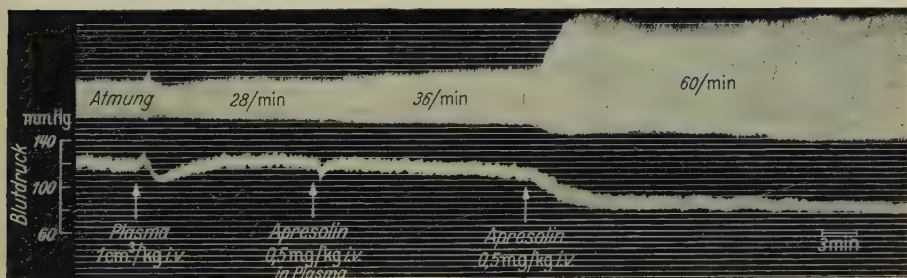


Abb. 1. Durch Inkubation in Kaninchenplasma wird die durch Apresolin 0,5 mg/kg i.v. erzeugte Blutdrucksenkung am Kaninchen fast vollständig aufgehoben. Die Kontrollverabreichung von Plasma ist praktisch ohne Wirkung auf den Blutdruck.

bei 37° C die blutdrucksenkende Wirkung der beiden Hydrazinophthalazin-Derivate deutlich zu hemmen und sogar vollständig aufzuheben vermag. Die Abb. 1 zeigt ein Beispiel der Wirkung von Apresolin nach Reaktion mit Kaninchenplasma.

Eine ähnliche Vorbehandlung von Apresolin und Nepresol mit homologem *Serum* ruft eine identische Aufhebung der Blutdrucksenkung

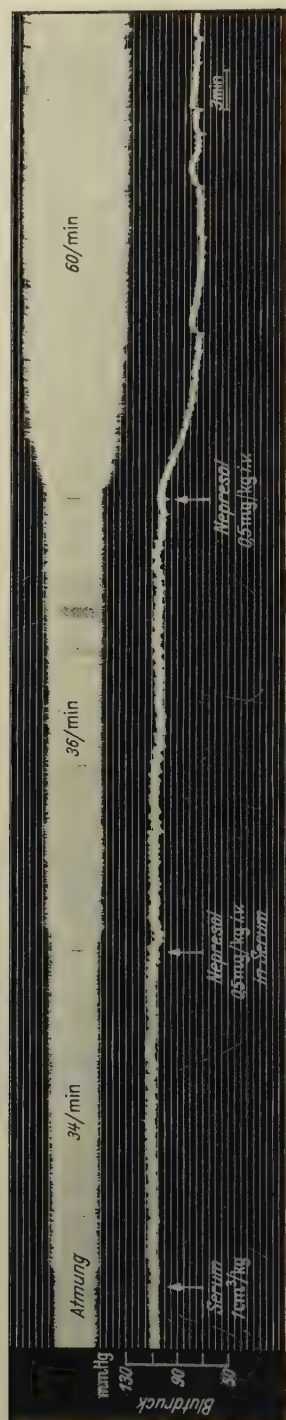


Abb. 2. Durch Inkubation in Kaninchenserum wird die durch Nepresol 0,5 mg/kg i.v. erzeugte Blutdrucksenkung am Kaninchen vollständig aufgehoben. Die Kontrollverabreichung von Serum ist praktisch unwirksam auf den Blutdruck.

hervor (Abb. 2). Die Inkubation mit anderen heterologen Plasmen oder Seren (Kaninchen-, Hammel-, Schweine- und Rinderserum; Menschenplasma) hemmt an Kaninchen sowie an der Katze (Dialnarkose 0,06 g/kg s. c. + i. p.) die Blutdrucksenkung ebenfalls und hebt sie sogar vollständig auf; die bekannte atemfördernde Wirkung der Hydrazinophthalazine wird dabei ebenfalls meistens gehemmt.

Auffallend ist die Beobachtung, daß die Inkubation z. B. von Apresolin 5×10^{-4} im heterologen Pferdeserum eine grundsätzliche Änderung des Blutdrucksenkungstypus, aber keine Aufhebung der Wirkung hervorruft (Abb. 3).

Die Wirkung des Kaninchensersums auf die blutdrucksenkende Wirkung der Hydrazinophthalazine ist schon nach einer kürzeren Inkubation von 6 Std bei 37°C vorhanden, scheint aber unregelmäßiger zu sein. Nach einer 24stündigen Inkubation bei Zimmertemperatur ist sie ebenfalls vorhanden, dagegen ist sie nach 6 Std bei Zimmertemperatur oder nach 24 Std bei -8°C nur schwach. Bei steigenden Konzentrationen von Apresolin in Kaninchenserum wird die blutdrucksenkende Wirkung bei 5×10^{-4} vollständig, bei 10^{-3} teilweise und bei 5×10^{-3} praktisch nicht mehr aufgehoben. Die umgekehrte Prozedur, d. h. die Inkubation von Apresolin 5×10^{-4} bei absteigenden Konzentrationen von Kaninchenserum, zeigt mit Serum 1:10 nur eine partielle Aufhebung der Blutdruckwirkung. Es ergibt sich somit, daß optimale Verhältnisse von Konzentration und Zeit vorliegen müssen. Ferner haben wir beobachtet, daß die Inaktivierung von Kaninchenserum durch Erhitzen auf 56°C während 60 min, der Zusatz von

Penicillin 10 E/cc + Streptomycin 10^{-7} zum Serum oder das Sterilisieren von Serum durch EK-Seitzfilter die Aufhebung der blutdrucksenkenden Wirkung nicht beeinflussen.

Es schien nun wichtig, nachzuweisen, ob diese Aufhebung der Wirkung von Apresolin und Nepresol auch an anderen Testobjekten vorhanden ist, wie z. B. an den Coronargefäßen die primäre starke Erweiterung und die Antagonismen gegenüber BaCl_2 und Pitressin darstellen, und an den

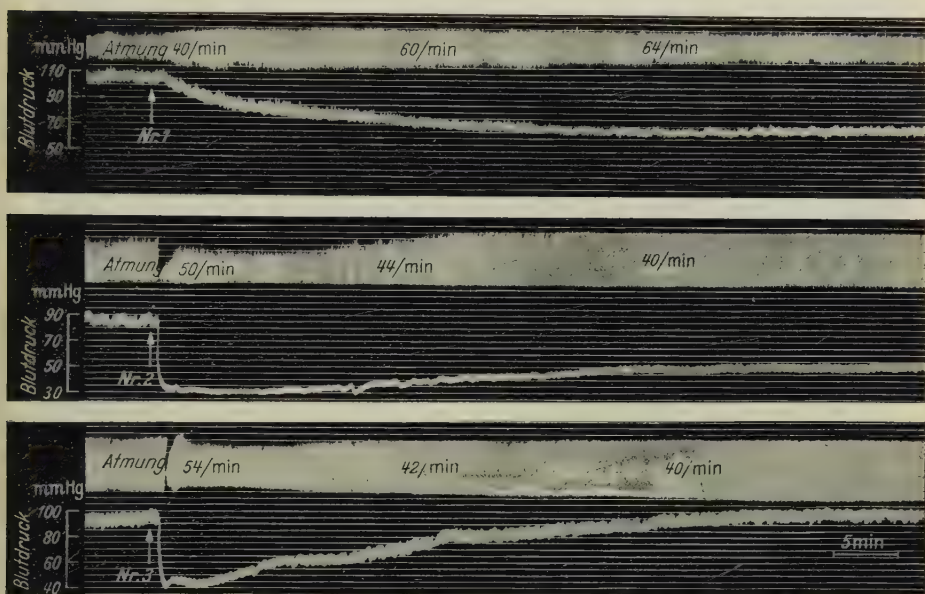


Abb. 3. Blutdruckwirkung am Kaninchen. Kontrollversuch mit Apresolin 0,5 mg/kg i.v. (Nr. 1). Nach Inkubation während 24 Std (Nr. 2) und 48 Std (Nr. 3) in sterilem Pferdeserum wird der Charakter der durch Apresolin 0,5 mg/kg i.v. erzeugten Blutdrucksenkung stark geändert.

Gefäßen der Kaninchenhinterextremitäten die ausgesprochenen Antagonismen gegenüber BaCl_2 und Histamin. Bei diesen Untersuchungen ergab sich, daß bei der Durchströmung der isolierten Gefäße der Hinterextremität des Kaninchens^{9, 10, 15, 16} der Antagonismus von Apresolin 10^{-6} bzw. Nepresol 10^{-6} gegenüber BaCl_2 2×10^{-4} oder Histamin 5×10^{-7} durch die Inkubation mit homologem Serum während 24 Std bei 37° stark gehemmt bis vollständig aufgehoben wird (Abb. 4 und 5).

Bei Durchströmung des isolierten Kaninchenherzens nach LANGENDORFF¹¹⁻¹⁷ zeigte sich ebenfalls, daß die Inkubation im homologen Serum die antagonistische Wirkung von Apresolin 10^{-6} oder Nepresol 10^{-6} gegenüber BaCl_2 5×10^{-5} stark hemmt und sogar aufhebt, gegenüber Pitressin 1 I. E. dagegen unwirksam ist (Abb. 6).

Die Mehrheit dieser Teste ergab somit übereinstimmend die Aufhebung der Apresolinwirkung durch die Inkubation. Um so auffallender

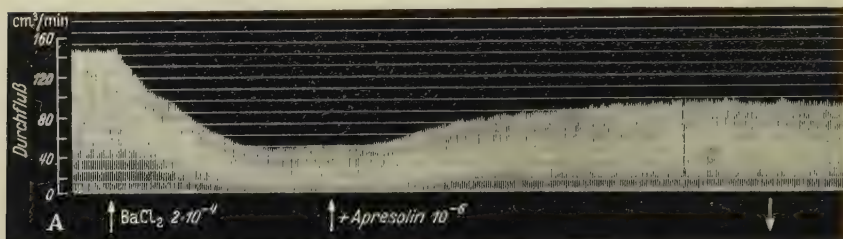


Abb. 4a.

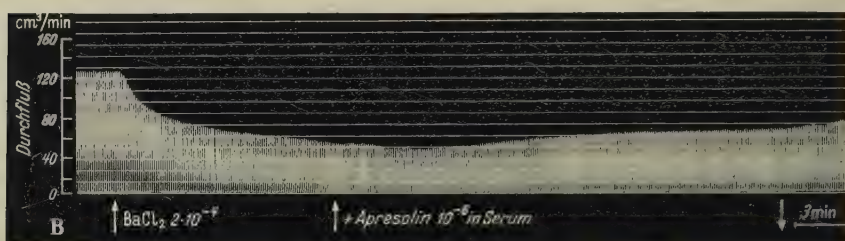


Abb. 4b.

Abb. 4a und b. Durchströmung der isolierten Gefäße der Hinterextremitäten des Kaninchens. Die antagonistische Wirkung von Apresolin 10^{-6} gegenüber $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \cdot 10^{-4}$ (A) wird durch Inkubation in Kaninchenserum gehemmt (B).

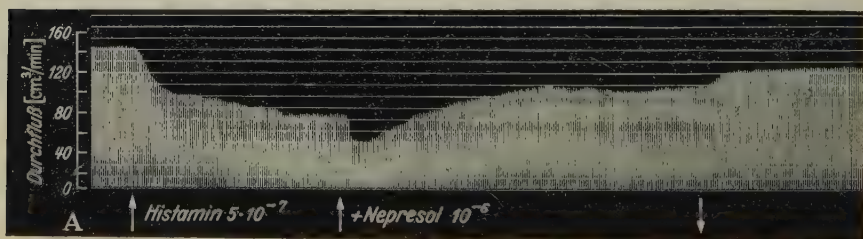


Abb. 5a.

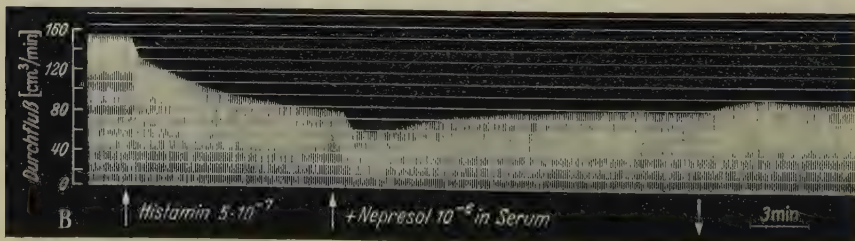


Abb. 5b.

Abb. 5a und b. Durchströmung der isolierten Gefäße der Hinterextremitäten des Kaninchens. Die antagonistische Wirkung von Nepresol 10^{-6} gegenüber $\text{Histamin } 5 \cdot 10^{-7}$ (A) wird durch Inkubation in Kaninchenserum gehemmt (B).

ist es, daß die direkte primäre Wirkung von Apresolin und Nepresol auf die Coronargefäße, d. h. eine deutliche bis starke Erweiterung, nicht gehemmt wird (Abb. 7), obwohl die blutdrucksenkende Wirkung solcher



Abb. 6 a.



Abb. 6 b.

Abb. 6a und b. Isoliertes Kaninchenherz nach LANGENDORFF. Die antagonistische Wirkung von Apresolin 10⁻⁶ gegenüber BaCl₂ 6 · 10⁻⁵ an den Coronargefäßen wird durch Inkubation in Kaninchenserum aufgehoben (A). Der Antagonismus gegenüber Pitressin 1 I. E. wird nicht beeinflußt (B).

Apresolin- bzw. Nepresollösungen in Serum nicht mehr vorhanden war und die Kontrolldurchströmung mit entsprechenden Mengen von Serum allein an den Coronargefäßen bzw. an den isolierten Hinterextremitätsgefäßen meistens nur eine geringe Verengung erzeugt. Auf dieses Verhalten werden wir unten (S. 345) zurückkommen.

Diskussion.

Zur Deutung der geschilderten Hemmwirkung bieten die komplexe Zusammensetzung des Serums und die relativ starke chemische Reaktivität der Hydrazingruppe viele theoretische Möglichkeiten. Eine Bakterienwirkung während der Inkubation ist als sehr unwahrscheinlich anzusehen, da der Zusatz von Antibiotica sowohl als die Anwendung von sterilen Lösungen die Reaktion von Apresolin und Nepresol mit dem Serum nicht zu beeinflussen vermag. Unter solchen Mechanismen bzw.

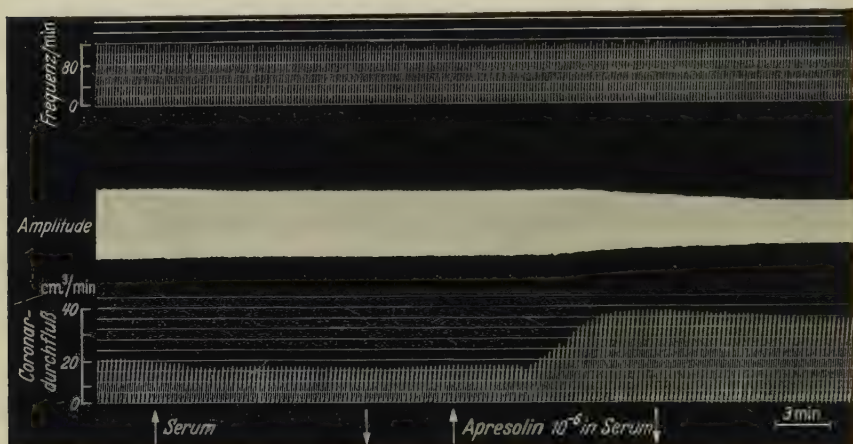


Abb. 7. Isoliertes Kaninchenherz nach LANGENDORFF. Die primäre coronarerweiternde Wirkung von Apresolin 10^{-6} wird durch Inkubation in Kaninchenserum nicht aufgehoben.

Angriffspunkten sind Reaktionen der Hydrazinophthalazine mit reaktionsfähigen Gruppen von Fetten, Kohlenhydraten, stickstoffhaltigen Verbindungen, Nucleosiden, Mucoproteinen, Enzymen, usw. sehr wohl möglich. Die einfachste Möglichkeit, den „Reaktionsort“ weiter zu bestimmen, schien die Untersuchung von Ultrafiltrat des Serums zu sein. Es ergibt sich, daß Apresolin im Serumultrafiltrat bei gleicher Inkubation wesentlich stabiler ist. Somit wird der „Reaktionsort“ in der Eiweißfraktion zu suchen sein. Dabei ist die Fibrinogenfraktion des Plasmas wohl nicht maßgebend, da Serum und Plasma praktisch gleich wirken. Eine Beteiligung der Komplementfraktion ist ebenfalls wenig wahrscheinlich, da das inaktivierte Serum auch hemmend wirkt.

Es war somit naheliegend, die Einwirkung von „strukturlosen“ Proteinen auf die blutdrucksenkende Wirkung von Apresolin und Nepresol zu untersuchen. Dabei ergab sich, daß die 24—48stündige Inkubation von Apresolin 5×10^{-4} in 50% iger Hühnereiweißlösung eine vollständige, in 8% iger Caseinlösung nur eine schwache, aber in 8% iger Lösung von Polypeptid (mit EK-Seitzfilter sterilisiertem Pepton aus Schweine-

proteinen) eine starke Hemmung erzeugt. Dagegen ruft die Vorbehandlung mit einer Caseinhydrolysatlösung (5% igem „Protolysate“) nur eine schwache und mit der Aminosäuremischung VU³ praktisch keine Hemmung der blutdrucksenkenden Wirkung von Apresolin hervor. Solche Versuche zeigen eindeutig, daß die Reaktion von Apresolin mit „Proteinen“ von ihrer chemischen Zusammensetzung abhängig ist, und daß sie bereits mit Polypeptiden zustandekommen kann. Es sei hier noch erwähnt, daß diese Plasma-, Serum-, Protein- und Polypeptidlösungen nach Inkubation mit Apresolin bzw. Nepresol eine verschieden dunkle, meist braune, rote oder grüngelbliche Färbung zeigen, ohne daß diese parallel mit der Hemmung der Blutdruckwirkung verläuft.

Der Unterschied der Beeinflussung durch Kaninchenserum und Pferdeserum zeigt weiterhin, daß offenbar qualitativ zwei verschiedene Reaktionsformen vorliegen; die eine Reaktion führt zur Aufhebung der Wirkung, die andere zum Auftreten eines „Reaktionsproduktes“ mit veränderter Wirkung. Eine solche Möglichkeit wird auch weiterhin dadurch wahrscheinlich gemacht, daß die Aufhebung der Blutdruckwirkung und die Hemmung des peripheren BaCl₂- und Histaminantagonismus zwar parallel gehen, daß aber die primäre Wirkung auf die Coronargefäße oder der Pitressinantagonismus nicht gehemmt werden. Es bleibt hierbei vorläufig fraglich, ob für diese Wirkungen ein besonderes „Reaktionsprodukt“ verantwortlich ist. Es ist aber denkbar, daß auch die letzteren Wirkungsteile direkt und in besonderer Hinsicht für die hypotensive Kreislaufwirkung in Betracht kommen können. Besonders die Reaktion mit Pferdeserum bedarf einer eingehenden Analyse ihrer Bedeutung innerhalb der Wirkungsreaktionen.

Bevor diese gesamte Sachlage beurteilt werden kann, bleiben noch einige Fragen zu beantworten:

1. Welcher Art ist die Reaktion des Apresolin und in welcher „unwirksamen“ Form liegt es vor?
2. Ist die Reaktion nur ein „Entgiftungsvorgang“, d. h. hat sie etwas mit dem Unwirksamwerden der Substanz zu tun?
3. Ist eine analoge Reaktion auch für die Wirkung des Apresolin an den Gefäßen usw. verantwortlich?

Hinsichtlich der ersten Frage kann gesagt werden, daß trotz der auftretenden Verfärbung, die möglicherweise eine Komplexbildung anzeigt, Apresolin mit chemischen Methoden noch etwa in der zugesetzten Menge nachgewiesen werden kann*. Das kann bedeuten, daß der Anteil, der die Ursache der chemischen Bestimmungsreaktion ist, nicht verändert wird, oder daß Apresolin in einer locker gebundenen Form vorliegt, die zwar

* Wir danken den Herren Dr. H. EGLI und Dr. A. BECKER für die Analysen von Apresolin (colorimetrische Bestimmung der Hydrazingruppe mit 1-2-Naphthochinon-4-sulfosäure).

den chemischen Nachweis nicht verändert, aber die Unwirksamkeit bedingt. Diese Frage bedarf gründlicher Abklärung.

Zu den Fragen 2 und 3 nach dem Zusammenhang der Reaktion mit der Wirkung haben wir untersucht, ob eine analoge Reaktion auch mit Gefäßwandbrei erfolgt. Dies ist in der Tat der Fall: Die 24stündige Inkubation von Apresolin 5×10^{-4} in Arterienbrei (Kalbsarterien mit 0,9% NaCl 1:3 verdünnt) ergab ebenfalls eine vollständige Hemmung der sonst durch Apresolin 0,5 mg/kg i.v. erzeugten charakteristischen Blutdrucksenkung.

Für den Beweis eines direkten Zusammenhanges dieser Reaktion mit der Wirkung bleibt noch nachzuweisen, ob die Gefäßwand parallel zur auftretenden „Reaktion mit Apresolin“ entsprechend veränderte Reaktionsfähigkeit zeigt. Diese Frage wird geprüft. Doch ergibt sich aus dem vorliegenden Versuch bereits, daß auch ein Objekt, dessen Reaktionsverhalten bei der pharmakologischen Wirkung direkt beteiligt ist, mit Apresolin zu „reagieren“ vermag.

Es ist vorläufig nicht möglich, durch die obigen Versuche die Natur der Reaktion von Apresolin und Nepresol mit „Eiweißkörpern“ bzw. deren Bestandteilen näher zu bestimmen. Immerhin zeigen unsere Beobachtungen in eindeutiger Weise, daß gewisse Elemente, sei es in den Körperflüssigkeiten, sei es auch im Protoplasma der Gefäßwand, „in vitro“ mit einer langsamen Reaktionsgeschwindigkeit mit den Pharmaka „reagieren“ können. Mit Hilfe dieser Reaktion scheint es möglich, das funktionelle und physikalisch-chemische Verhalten spezifischer Zellsubstrate und Rezeptoren näher zu definieren, welche im Falle der Kreislaufwirkung von Apresolin und Nepresol a priori nicht zu den klassischen autonomen Rezeptoren zu gehören scheinen. Weitere Versuche sind in dieser Richtung nötig, nicht nur um den dafür verantwortlichen Reaktionsfaktor näher zu bestimmen und die Modalitäten dieser Reaktionen zu analysieren, sondern auch um das Verhalten anderer Pharmaka in dieser Hinsicht zu untersuchen.

In unserem besonderen Falle des Angriffspunktes von Apresolin und Nepresol und hinsichtlich der Eigenart ihrer allgemeinen Wirkungen und ihrer systemischen Effekte am Kreislauf scheinen die heutigen Beobachtungen imstande zu sein, frühere Befunde einer gemeinsamen Erklärung zuzuführen, indem der Wirkungscharakter der eigenartigen Blutdrucksenkung, das relativ komplizierte Spektrum der antagonistischen Wirkungen an isolierten Kreislauforganen, die antidiuretische Wirkung und eventuell sogar gewisse Nebenwirkungen dieser Stoffe^{5,6} durch eine besondere Reaktionsfähigkeit mit z. B. „proteinartigen“ und eventuell anderen Elementen aufgefaßt werden kann, besonders da die klassischen Verhältnisse zum autonomen Nervensystem bzw. zu seinen bekannten peripheren oder zentralen Angriffspunkten nicht ohne weiteres befriedigende Interpretation des ganzen Wirkungsbildes der Hydrazinophthalazine zu geben vermochten. Es ist aber wohl möglich, daß „ähnliche“ Reaktionen mit „Proteinen“ an verschiedenen Organen bzw. Systemen

auftreten können, welche als bestimmende Faktoren der Wirkung der Hydrazinophthalazine in Betracht kommen.

Ein solcher Aspekt des Angriffspunktes neuer Pharmaka wie Apresolin und Nepresol scheint nicht nur von theoretischem, sondern auch von allgemeinem Interesse.

Zusammenfassung.

Durch Inkubation von Apresolin und Nepresol während 24 Std bei 37° C mit homologem Plasma oder Serum wird die eigenartige blutdrucksenkende Wirkung dieser Hydrazinophthalazin-Derivate gehemmt bis vollständig aufgehoben. Diese „in vitro“-Reaktion von Apresolin und Nepresol ist zeitabhängig und wird durch die Temperatur begünstigt. Sie ist ebenfalls nach Inkubation mit gewissen heterologen Sera, Plasma, mit strukturlosen Proteinen oder Polypeptiden vorhanden. Eine ähnliche „Inaktivierung“ von Apresolin wird durch Inkubation mit Arterienbrei hervorgerufen. Die Vorbehandlung mit anderem Serum (Pferdeserum) ändert den Charakter der durch Apresolin erzeugten Blutdrucksenkung stark.

Gleichzeitig mit der Aufhebung der blutdrucksenkenden Wirkung werden die peripheren Antagonismen von Apresolin und Nepresol gegenüber BaCl_2 und Histamin an den isolierten Hinterextremitätsgefäßen und von BaCl_2 an den Coronargefäßen des isolierten Warmblüterherzens aufgehoben, die direkte erweiternde Wirkung und der Pitressinantagonismus an den Coronargefäßen dagegen nicht beeinflusst.

Die Bedeutung dieser Reaktionsfaktoren für die Kreislaufwirkung von Apresolin und Nepresol, die Auffassung der verschiedenartigen Struktur peripherer Rezeptoren und der allgemeine pharmakodynamische Aspekt solcher Reaktionen von Pharmaka werden besprochen.

Literatur.

- ¹ BEIN, H. J., J. TRIPOD u. R. MEIER: *Experientia* (Basel) 8, 74 (1952). —
- ² BEIN, H. J., F. GROSS, J. TRIPOD u. R. MEIER: *Schweiz. med. Wschr.* 1953, 336. —
- ³ COX, W. M., and A. J. MUELLER: *J. Nutrit.* 31, 581 (1946). — ⁴ DRUEY, J., B. RINGIER: *Helvet. chim. Acta* 34, 195 (1951). — ⁵ DUSTAN, H. P., R. D. TAYLOR, A. C. CORCORAN and I. H. PAGE: *J. Amer. Med. Assoc.* 154, 23 (1954). — ⁶ ESSELLIER A. F., W. LÜSCHER u. L. MORANDI: *Schweiz. med. Wschr.* 1953, 345. — ⁷ GROSS, F., J. DRUEY u. R. MEIER: *Experientia* (Basel) 6, 11 (1950). — ⁸ GROSS, F., W. SCHULER, J. TRIPOD u. R. MEIER: *Experientia* (Basel) 8, 229 (1952). — ⁹ MEIER, R., u. R. TH. MEYER: *Schweiz. med. Wschr.* 1941, 1206. — ¹⁰ MEIER, R., u. J. TRIPOD: *Helvet. physiol. Acta* 8, 137 (1950). — ¹¹ MEIER, R., et J. TRIPOD: *Arch. internat. Pharmacodynamie* 89, 326 (1952). — ¹² MEIER, R., et J. TRIPOD: *Arch. internat. Pharmacodynamie* 95, 30 (1953). — ¹³ TRIPOD, J., E. WIRZ et R. MEIER: *Arch. internat. Pharmacodynamie* 88, 51 (1951). — ¹⁴ TRIPOD, J., W. SCHULER u. R. MEIER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 220, 268 (1953). — ¹⁵ TRIPOD, J., et R. MEIER: *Arch. internat. Pharmacodynamie* 97, 251 (1954). — ¹⁶ TRIPOD, J., et R. MEIER: *Arch. internat. Pharmacodynamie* (im Druck). — ¹⁷ UHLMANN, F., u. F. NOBILE: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* 192, 189 (1939).

Prof. Dr. ROLF MEIER, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba AG., Basel/Schweiz.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. LENDLE).

Zur Wirkung der morphinähnlich wirkenden Analgetica auf den Meerschweinchendünndarm in situ.

Von

WOLFGANG SCHAUMANN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. Juni 1954.)

Der Umfang der Literatur über die Darmwirkung des Morphins läßt erkennen, wie unsicher ihre Beurteilung ist, und die widersprechenden Ergebnisse beweisen es. Die abweichende Reaktion der verschiedenen Tierarten und die verschiedenen Arten von Darmbewegungen erschweren jeden Vergleich.

Das Meerschweinchen eignet sich zur Analyse, weil rhythmische Pendelbewegungen fehlen, die Peristaltik (P) sich dagegen sicher und regelmäßig auslösen läßt. Trotzdem divergieren auch hier die Ergebnisse. Am isolierten Organ fand TRENDELENBURG eine Hemmung der Peristaltik durch Morphin. BAUR bestritt diesen Befund, den GARRY jedoch bestätigen konnte. In letzter Zeit fanden O. SCHAUMANN u. Mitarb. (1952) eine Parallelität im Verhältnis der analgetischen und der peristaltiklähmenden Dosen der morphinähnlich wirkenden Analgetica (m. ä. A.). Es lag nahe, diese Ergebnisse am Meerschweinchendarm in situ nach der Methode von STRAUB u. VIAUD nachzuprüfen.

STRAUB u. Mitarb. haben schon zu dieser Frage wertvolle Vorarbeit geleistet, aber auch manche widerspruchsvollen Angaben nicht klären können. So schreiben STRAUB u. LEO (S. 7): „0,075 mg lähmt am Tier von 380 g die P für den Schwellenreiz. Erst eine sehr starke Erhöhung der Schwelle wird wieder wirksam.“ Dagegen STRAUB u. OZAKI (S. 375): „Selbst die 500fache Menge der wirksamen Schwellendosis Morphin hat bei geeigneter Füllung noch eine ganz normale P ausgelöst.“ Die Druckschwelle sei dabei nicht wesentlich erhöht. Dieser Widerspruch und die Tatsache, daß in der Literatur gewöhnlich die zweite Ansicht STRAUBS zitiert wird (VÖLKER; HILDEBRANDT u. MATTHÄY), waren eine weitere Veranlassung zu den vorliegenden Untersuchungen.

Seit den Arbeiten von STRAUB ist durch die Entdeckung synthetischer m. ä. A. die Beziehung zwischen analgetischer und Darmwirkung in den Vordergrund des Interesses getreten. Neben dem Verhältnis der wirksamen Dosen der verschiedenen Analgetica bietet der Vergleich zwischen den optischen Isomeren einen Vorteil gegenüber den älteren Arbeiten. Außerdem macht das N-allyl-normorphin (Nal) als Antagonist es möglich, jederzeit die Spezifität einer erzielten Wirkung nachzuprüfen.

Method.

Die Versuche wurden an 25 Meerschweinchen beiderlei Geschlechts von 400 bis 800 g durchgeführt. Tags zuvor wurden die Tiere nüchtern gesetzt und erhielten 1 Std vor der Operation 1 g/kg Urethan sc., zur Laparatomie dazu Äther bis zur Vollnarkose. Waren die Tiere nach Abrauchen des Äthers noch sehr unruhig, so erhielten sie noch einmal 0,2 g/kg Urethan i.v. Besonders wichtig ist es, vor und nach der Operation für genügende Erwärmung zu sorgen und die Rectaltemperatur dauernd zu kontrollieren. Bei der Operation hielt ich mich streng an die von STRAUB u. Mitarb. gegebenen Vorschriften. Die normale Druckschwelle für die P liegt dann zwischen 3 und 7 cm Wasser. Höhere Werte sprechen für einen schlechten Zustand des Versuchstieres.

Das verwendete Wassermanometer hatte einen Querschnitt von 1 cm², so daß 1 ml Füllung einen Druckzuwachs von 1 cm ergab. Mit einer Mikrometerschraube und einem Metronom, das den Takt gab, wurde die Füllungsgeschwindigkeit konstant auf 1 ml in 16 sec gehalten und die Füllung bis zum Auftreten der P, nie über 12 cm Innendruck fortgesetzt, um eine Überdehnung zu vermeiden. Die Druckschwelle der P ließ sich auf diese Weise sehr genau ermitteln und blieb über längere Zeit konstant. Die Füllung des Darmes bei jedem Druck ließ sich durch Vergleich mit einer Eichkurve ermitteln, die man erhält, wenn man die Verbindung zum Darm abklemmt. Wenn z. B. nach einer Füllung des Systems mit 4 ml nur ein Druck von 3,7 cm erreicht wird, so müssen die restlichen 0,3 ml in den Darm eingeflossen sein.

In 3 Versuchen wurden die Nebennieren per laparatomiam abgebunden, der richtige Sitz der Ligatur autoptisch bestätigt.

Alle geprüften Substanzen wurden durch eine Kanüle in die V. jugularis injiziert.

Ergebnisse.

1. *Die Druckschwelle der Peristaltik.* Grundsätzlich ist zu sagen, daß alle geprüften m. ä. A. die Druckschwelle erhöhen. Für Morphin liegt die Schwellendosis wie bei STRAUB u. Mitarb. bei 0,1 mg/kg. Die Wirkung von 0,2 mg/kg war bereits sehr deutlich und wurde als Bezugsgröße verwandt, bei wenig empfindlichen Tieren auch 0,5 mg/kg. Nach Nal kehrte die Druckschwelle prompt auf ihre alte Höhe zurück (Abb. 1). FROMHERZ u. PELLMONT haben mit dem N-allyl-noroxymorphan das selbe Ergebnis erzielt. Sonst klang die Wirkung in etwa 15 min ab.

Bemerkenswert neben dieser qualitativen Konstanz der Wirkung ist ihr Schwanken in quantitativer Hinsicht. Der Unterschied der Empfindlichkeit von Tier zu Tier ist weniger auffällig als ihre gelegentliche Abnahme bis auf 0 im Verlaufe eines Versuches, besonders nach wiederholten Gaben. In diesem Stadium ist die P auch gegen alle anderen Analgetica refraktär; Polamidon erregt sogar ein wenig, vermutlich durch seine vagotrope Wirkung (KRAUSE u. RUHNAU). Im Gegensatz zu STRAUB u. FERNANDEZ konnte in diesem Stadium wie überhaupt die P mit 0,1 mg/kg Atropin vollständig aufgehoben werden, was wieder den Verhältnissen am isolierten Organ entspricht. An anderen Tieren, die gut ansprachen, war die P dagegen immer wieder bis zu dem höchsten geprüften Druck von 12 cm lähmbar.

Infolge dieser Schwankungen war eine Bestimmung des Verhältnisses der wirksamen Dosen, wie O. SCHAUMANN u. Mitarb. (1952) sie am isolierten Dünndarm feststellten, nur ungefähr möglich. Die Spezifität, d. h. die Beziehung zur analgetischen Wirkung, ist jedoch deutlich

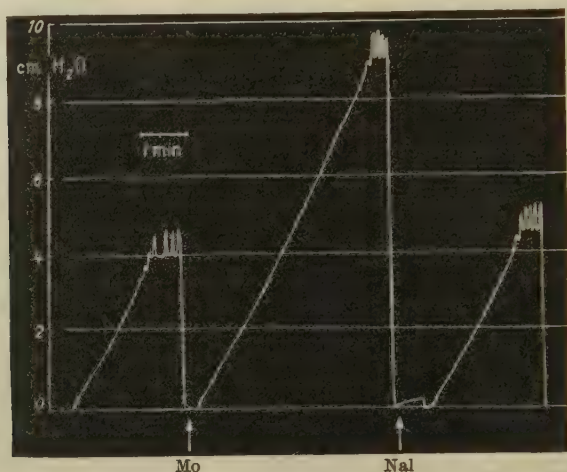


Abb. 1. Erhöhung der Druckschwelle durch 0,2 mg/kg Morphin i.v. bei Mo. Rückkehr zum normalen Schwellendruck nach 0,1 mg/kg N-allyl-normorphin bei Nal.

und wird besonders durch das Verhalten der optischen Isomeren unterstrichen. In Tab. 1 werden die gefundenen Werte mit denen von O. SCHAUMANN u. Mitarb. verglichen, wenn man die dort angegebene Wirksamkeit auf das Verhältnis der wirksamen Dosen umrechnet und auf 1-Polamidon = 1 bezieht.

Der Befund von STRAUB u. OZAKI, daß Morphin den *Mechanismus* der P nicht beeinträchtigt, läßt sich auch auf die anderen Analgetica ausdehnen. Wird die erhöhte Druckschwelle überschritten, so ist die

Tabelle 1.

	mg/kg Tier Darm in situ	Umgerechnet auf 1-Polamidon = 1	Am isolierten Organ bezogen auf 1-Polamidon = 1
Morphin	0,2	0,8	1,7
d,l-Polamidon ¹	0,5	2,0	—
1-Polamidon	0,25	1	1
d-Polamidon	4,0	16	15
Dolantin ²	2,0	8	13
1-Dromoran ³	0,05	0,2	0,85
d-Dromoran	unwirksam	unwirksam	225

¹ Polamidon = Markenname für dl-Dimethylamino-4,4-diphenylheptanon-5;

² Dolantin = Markenname für 1-Methyl-4-phenylpiperidin-carbonsäure-äthylester;

³ Dromoran = Markenname für dl-3-Oxy-N-Methyl-morphinan.

Leistung der nun einsetzenden P-Gruppe nicht vermindert, manchmal sogar (durch die vermehrte Füllung) erhöht.

Da Morphin nach Befunden von SATO u. OHMI sowie EVANS, NASMYTH u. STEWART Adrenalin aus den Nebennieren freisetzt, entstand die Frage, ob ihre lähmende Wirkung über eine Adrenalinausschüttung zu erklären sei. Durch Unterbindung der Nebennieren in 3 Versuchen wurde die Erhöhung der Druckschwelle durch Morphin nicht verhindert.

2. *Veränderungen in der Dehnbarkeit.* Morphin in kleinen Dosen und Dolantin haben eine Zunahme der Dehnbarkeit zur Folge. Nach wiederholten steigenden Dosen Morphin (3,5 mg/kg) kann man jedoch unter Umständen beobachten, daß der Tonus wieder zunimmt. Polamidon und Dromoran erhöhen die Dehnbarkeit nicht. Nach Abschluß der Untersuchungen erschien eine Arbeit von HILDEBRANDT u. MATTHÄY, worin Abb. 2 und 3 genau dieselben Befunde veranschaulichen, so daß sich eine Abbildung erübrigt. Auf die Deutung von HILDEBRANDT u. MATTHÄY wird bei der Besprechung der Ergebnisse einzugehen sein.

Obige Ergebnisse lassen sich bei der Sichtung aller Befunde mit Sicherheit herauschälen. Trotzdem scheint die STRAUBsche Methode zur Prüfung des Tonus wenig geeignet, da sie erhebliche Fehlerquellen hat. Alle gewonnenen Zahlen können nur relativen Wert haben durch die Bauchdeckenspannung und die wechselnde Füllung der Eingeweide. Je länger die eingebundene Schlinge ist, um so mehr Flüssigkeit wird sie bei gegebenem Druck fassen. Bei Verwendung längerer Darmstücke, wie sie von STRAUB zur Vermeidung von Hemmreflexen empfohlen wird, tritt leicht ein Knick auf, der erst durch höheren Druck ausgeglichen wird. Das erklärt STRAUBs Beobachtung, daß ein ermüdeter Darm sich erst bei höherem Druck, dann aber sehr schnell füllt. Eine Resorption von Wasser ist nie zu beobachten, dagegen findet häufig eine Ausscheidung von Flüssigkeit in das abgebundene und auch in das orale Darmstück statt. Eröffnet man das Abdomen, so findet man die Darmschlinge gefüllt, auch wenn nach der Füllung des registrierenden Systems keine Zunahme des Restvolumens zu erkennen war. Der „Tonus“ ist daher am geschlossenen Abdomen kaum festzustellen, und es wäre besser, bei Verwendung dieser Methode von *Dehnbarkeit* zu sprechen. Mehr kann man streng genommen nicht mit ihr erfassen.

Eine *akute* Zunahme des Restvolumens, wie STRAUB sie nach Morphin beschreibt, ist eine Folge der Überdehnung. Man kann sie auch ohne Morphin erhalten, wenn man den Druck über den Beginn der P hinaus steigert.

Besprechung der Ergebnisse.

Die angestellten Versuche ergaben, daß alle m. ä. A. die *Druckschwelle* dosisabhängig im Verhältnis ihrer analgetischen Wirksamkeit erhöhen. Den *Mechanismus* der P beeinträchtigen sie nicht. Ein Teil

der Widersprüche in der Literatur kann wohl auf die irrtümliche Gleichsetzung von auslösendem afferentem Reiz und Mechanismus der peristaltischen Rhythmik zurückgeführt werden. Gelegentlich nimmt die Empfindlichkeit der Versuchstiere nach wiederholten und höheren Dosen Morphin bis auf Null ab. Eine Deutung dieser Beobachtung soll nicht versucht werden.

Wenn man die Arbeiten von STRAUB u. Mitarb. durchsieht, so finden sich darin Angaben, die in Widerspruch zueinander stehen. Eine, die P betreffend, wurde eingangs schon erwähnt. STRAUB u. LEO sagen z. B., der peristaltische Reflex trete nach Morphin erst bei höherer Füllung, aber kaum erhöhtem Schwellendruck auf und belegen ihre Ansicht durch die Abb. 3. Aus Abb. 7 derselben Arbeit ersieht man jedoch, daß der normale Schwellendruck von 7 cm durch 1 mg Morphin so stark erhöht wurde, daß selbst bei 13 cm noch keine P auftrat. Aber auch über die Wirkung auf den Tonus, oder besser die Dehnbarkeit, kann man in Abb. 3 dieser Arbeit finden, daß die Füllung des Darmes nach Morphin, ähnlich wie beim ermüdeten Darm, erst bei höherem Druck einsetzt; nach STRAUB u. OZAKI (Abb. 1a) beginnt sie jedoch schon bei geringerem Druck als normal.

Hiernach waren von vornherein keine einheitlichen Ergebnisse zu erwarten. Leider diskutiert STRAUB in seinen späteren Arbeiten seine früheren Befunde nicht mehr, und auch sein Schüler RENTZ bezieht sich an einer Stelle darauf, daß „Morphin nur den Tonus, nicht aber die P lähmt“. Nach einer späteren Arbeit (RENTZ u. KESARBANI) „hat Morphin eine ganz spezifische peristaltiklähmende Wirkung“. Er lehnt auch die bisher angewendete sc. Applikation als zu unsicher ab und geht zur i.v. Injektion über.

Aus den Arbeiten von STRAUB u. Mitarb. geht es nicht klar hervor, ob er die Füllung des Darmes oder den Innendruck als adäquaten Reiz für die P ansieht. Nach seinen und den eigenen Befunden kommen beide in Frage. Es kann P durch hohen Druck bei mangelnder Füllung und andererseits bei geringerem Druck durch vermehrte Füllung ausgelöst werden. Nimmt man einen nervösen Angriffspunkt der m. ä. A. am Darm an (O. SCHAUMANN u. Mitarb. 1952), so kann man mit dieser Feststellung die Widersprüche überbrücken, wenn man bedenkt, daß auch die Dehnbarkeit zum Teil durch eine nervös vermittelte Gegenregulation gegen den Füllungsdruck bedingt wird (O. SCHAUMANN u. Mitarb. 1953). Zunahme der Dehnbarkeit muß nicht durch muskuläre Spasmolyse, sie kann auch durch Lähmung nervöser Elemente zustande kommen. Der Angriffspunkt der m. ä. A. ist im afferenten Schenkel des Reflexbogens zu suchen, da der Mechanismus der P erhalten bleibt.

Die Wirkung der m. ä. A. am Meerschweinchendarm in situ beruht sicher nicht auf einer Spasmolyse, denn die Druckschwelle wird noch erhöht, wenn keine Änderung der Dehnbarkeit mehr zu sehen ist. 1-Dromoran wirkt überhaupt nicht spasmolytisch, aber 4mal stärker als Morphin auf die Druckschwelle. Dagegen ist d-Dromoran völlig unwirksam, es wirkt sogar in geringem Maße der Wirkung der anderen Analgetica entgegen, wie O. SCHAUMANN u. Mitarb. (1953) das auch am

isolierten Organ beobachten konnten. Hinsichtlich ihrer spasmolytischen Wirksamkeit unterscheiden sich die optischen Isomeren nicht.

Die Abbildungen in der bereits zitierten Arbeit von HILDEBRANDT u. MATTHÄY stimmen mit den eigenen Befunden gut überein, doch würde ich eine andere Auslegung vorschlagen. Das Füllungsvolumen pro Druck hängt, wie gesagt, neben vielem anderen von der Länge des Darmstückes ab. Änderungen können daher nur im Vergleich mit einer Normalkurve festgestellt werden. In dem Druckbereich bis zum Einsetzen der P laufen die Dehnungskurven in allen 3 Abb. vor und nach Injektion der Analgetika ganz konform. Die Füllung nimmt z. B. nach Polamidon C nur deshalb weiter zu, weil höhere Drucke angewandt werden müssen, um eine P auszulösen. Ein Vergleich mit der Normalkurve ist in diesem Druckbereich nicht möglich und daher auch nicht die Feststellung, Polamidon C senke den Tonus. Es ist im Gegenteil bemerkenswert, daß trotz Zugabe eines Parasympathicolytikums die Dehnbarkeit *nicht* zunimmt. Erläuternd sei hinzugefügt, daß das letzte Stück der Dehnungskurve bei Annäherung an die Druckschwelle durch eine beginnende Kontraktion tonischer wird und sich zum Vergleich nicht mehr eignet.

In der älteren und neueren Literatur gibt es eine Reihe von Angaben über eine analgetische Wirkung des Adrenalins und anderer Sympathicomimetica. H. WEBER berichtete bereits 1904, daß Injektion von Adrenalin in die Carotis von Katzen zu einer kompletten Analgesie für die Dauer einer Stunde führt. Dabei bleiben aber Bewußtsein und die Empfindlichkeit für sensorische Reize wie Geräusch, Licht oder Kitzeln erhalten. Die Wirkung soll daher direkt an den mit der Schmerzperzeption verbundenen Zentren unabhängig von der gefäßverengernden Wirkung angreifen. Über eine klinische Anwendung dieser „analgetischen“ Wirkung berichtet GAISBÖCK. Nach einer neueren Mitteilung von LEIMDORFER führt intrazisternale Injektion von 0,5–1,5 mg Adrenalin an Hunden zu einem mehrstündigen „Schlaf“ mit kompletter Analgesie. Auf Grund dieser Ergebnisse stellten IVY, GÖTEL u. BURRILL die Hypothese auf, daß die analgetische Wirkung des Morphins durch die Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren bewirkt würde. Dieser Hypothese schließen sich auch ELLIOT u. Mitarb. an, da nach ihren Versuchen über die Verteilung des Methadon (vgl. „Polamidon“, Fußnote S. 350) im Organismus die höchste Konzentration in den Nebennieren vorhanden ist, während im ZNS nur Spuren nachweisbar sind. Gestützt wird diese Hypothese noch durch Versuche von FRIEND u. HARRIS, wonach an adrenaletomierten Ratten mit Nebennierenrinden-Transplantaten Morphin schwächer analgetisch wirkt als an normalen Tieren. Auch andere Sympathicomimetica haben nach KRESSIG u. ORZECOWSKI am Hundezahntest eine gewisse analgetische Wirkung.

Es war daher naheliegend, auch die Hemmung der P-Auslösung am Ganztier auf eine Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren zurückzuführen. Da die m. ä. A. jedoch auch am isolierten Darm die P hemmen, war die Annahme von vornherein unwahrscheinlich. Ligatur der Nebennierengefäße in 3 Versuchen verhinderte dementsprechend die Hemmung der P durch Morphin nicht. Dagegen bleibt die Möglichkeit einer direkten Erregung adrenerger Elemente des Darmes durch die m. ä. A. noch offen.

Zusammenfassung.

Es wird die Wirkung der morphinähnlich wirkenden Analgetica (m. ä. A.) auf den Meerschweinchendarm in situ nach der Methode von STRAUB u. VIAUD untersucht.

1. Die m. ä. A. erhöhen die Druckschwelle der Peristaltik in einem Dosenverhältnis, das ihrer analgetischen Wirksamkeit entspricht.

2. Dieser Effekt beruht nicht auf einer muskulären Spasmolyse. Zunahme der Dehnbarkeit ist nicht bei allen m. ä. A. zu beobachten und muß als Nebenwirkung betrachtet werden.

3. Die m. ä. A. lähmen den Darm nicht über eine Adrenalinausschüttung aus den Nebennieren.

Literatur.

- BAUR, M.: Z. exper. Med. **44**, 540 (1925). — ELLIOTT, H. W., F. CHANG, I. A. ABDON and H. H. ANDERSON: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 494 (1949). — EVANS, A. G., P. A. NASMYTH and H. C. STEWART: Brit. J. Pharmacol. **7**, 542 (1952). — FRIEND, F. J., and S. C. HARRIS: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **93**, 161 (1948). — FROMHERZ, K., u. B. PELLMONT: Experientia Basel **8**, 394 (1952). — GAISBÖCK, F.: Med. Klin. **1913**, 405. — GARRY, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **120**, 345 (1927). — HILDEBRANDT, F., u. E. MATTHÄY: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **221**, 399 (1954). — IVY, A. C., F. R. GÖTZL and D. Y. BURRIL: War medicine **6**, 67 (1944). — KIESSIG, H. J., u. G. ORZECZOWSKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **197**, 391 (1940). — KRAUSE, D., u. D. RUHNAU: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **216**, 541 (1952). — LEIMDORFER, A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **98**, 62 (1950). — RENTZ, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **191**, 183 (1939). — RENTZ, E., u. D. KESARBANI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **198**, 107 (1941). — SATO, H., u. F. OHMI: Tohoku J. Exper. Med. **21**, 411 (1933). — SCHAUMANN, O., M. GIOVANNINI u. K. JOCHUM: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 460 (1952). — SCHAUMANN, O., K. JOCHUM u. W. SCHAUMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 360 (1953). — STRAUB, W., u. E. FERNANDEZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **170**, 26 (1933). — STRAUB, W., u. E. LEO: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 18 (1933). — STRAUB, W., u. M. OZAKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **173**, 374 (1933). — STRAUB, W., u. P. VIAUD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 1 (1933). — TRENDLENBURG, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **81**, 55 (1917). — VÖLKER, R.: XV. Internat. Tierärztl. Kongr. Stockholm 1953, Teil I, Bd. 2, S. 1012. — WEBER, H.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **21**, 616 (1904).

Dr. W. SCHAUMANN, Göttingen, Pharmacol. Institut der Universität.

Aus dem Tuberkulose-Forschungsinstitut Borstel,
Institut für experimentelle Biologie und Medizin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. FREERKSEN).

Zur Dauer der Nebennierenrinden-Aktivierung nach ACTH und ACTH-Depot.

Von

JOACHIM KRACHT.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Juni 1954.)

Ablauf und Umfang der durch Corticotropin ausgelösten Nebennierenrindenstimulierung werden im wesentlichen von der Dosis, der Applikationsart und der Dauer der Hormonwirkung bestimmt und durch verschiedene Funktionsproben quantitativ erfaßt.

Einmalige ACTH-Zufuhr bedingt bereits nach 20 min eine deutliche Verminderung der Ascorbinsäurekonzentration in der Nebenniere (NN); sie erreicht nach etwa 1 Std ihr Minimum, um dann in der 3. Std wieder anzusteigen und sich nach 9—12 Std zu normalisieren (SAYERS u. Mitarb.). Im Eosinophilentest tritt die maximale Wirkung etwa 8 Std nach Injektion auf, dann erfolgt ebenfalls eine verhältnismäßig schnelle Normalisierung bis zum 24 Std-Wert. In ähnlicher Weise sinkt der Cholesteringehalt der NN, steigt danach aber langsamer an und liegt nach 24 Std noch um 25% unter der Norm (SAYERS u. SAYERS). Analog steigt die Ausscheidung der 17-Ketosteroide im Harn, und zwar proportional dem Logarithmus der angewandten ACTH-Dosis (RENOLD u. Mitarb.). Als qualitatives morphologisches Äquivalent zur Cholesterinverarmung gilt das Verhalten der gewöhnlichen Lipide, der Cholesterinester und der doppelt brechenden Lipide in der Nebennierenrinde (NNR). Die strukturelle Funktionsanpassung äußert sich vor allem in einer Verbreiterung der gesamten Rinde mit Zell- und Kernschwellung, vornehmlich der Z. fasciculata (progressive Transformation) sowie in einer mäßigen Größen- und Gewichtszunahme des Organs.

Während diese Befunde im Initialstadium und auf der Höhe der NNR-Stimulierung allgemein bekannt sind, liegen praktisch keine Angaben über die Dauer der morphologischen Veränderungen nach einmaliger ACTH-Gabe vor. Lediglich O'DONNELL, FAJANS u. WEINBAUM berichten über das strukturelle Verhalten von NN menschlichen Sektionsmaterials nach zurückliegender ACTH-Behandlung. (Intervall von 1, 5, 10 und 23 Tagen.) Bis zum 10. Tage waren die Lipide in der Rinde vermindert oder fehlten ganz, nach 23 Tagen wurde sudanophiles Material in Form feiner Sekretgranula angetroffen, in sämtlichen Fällen bestand eine Hypertrophie der Z. fasciculata. Allerdings blieb dabei unberücksichtigt, daß sich das jeweilige Grundleiden als unspezifischer Belastungsreiz zusätzlich ausgewirkt haben mag. In einem weiteren Fall wurden 6 Monate nach Verabreichung von insgesamt 480 mg ACTH innerhalb von 3 Tagen keine besonderen Veränderungen in der NNR festgestellt, allerdings fehlen Angaben über die Grundkrankheit.

Eigene Untersuchungen hatten das Ziel, experimentell die Dauer der NNR-Aktivierung nach einmaliger ACTH-Gabe zu verfolgen und im

Hinblick auf therapeutische Konsequenzen die Wirkung von gewöhnlichem und Depot-ACTH miteinander zu vergleichen.

An männlichen weißen Ratten im Gewicht zwischen 130 und 195 g (Standardfütterung, Stalltemperatur durchschnittlich 18—20°) wurden folgende Versuchsreihen durchgeführt:

1. 18 Tiere erhielten je 6 i.E. ACTH (Cortiphyson¹, Promonta) i.m.
2. 18 Tieren wurden je 6 i.E. ACTH-Depot (Cortiphyson-Depot, Promonta) i.m. verabfolgt.
3. 18 Kontrollen.

In variiertem Abstand von 1 Std bis 14 Tagen nach Injektion erfolgte die gleichzeitige Tötung je eines Tieres jeder Gruppe durch Chloroform. Die NN wurden gewogen, die li. in Bouin'sche Flüssigkeit, die re. in neutrales Formol eingelegt. Zur Beurteilung diente die vergleichende Karyometrie. Die Auswertung

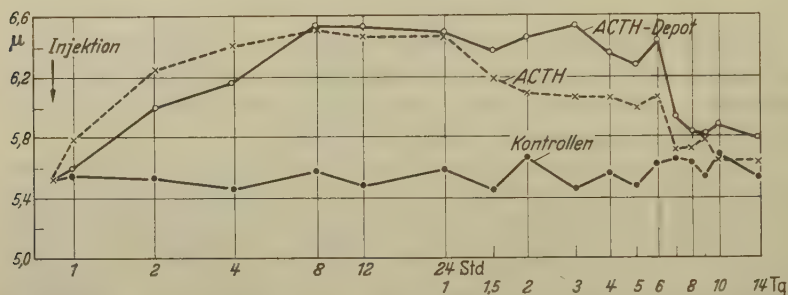


Abb. 1. Karyometrische Befunde zur Wirkung von ACTH und ACTH-Depot auf die Zona fasciculata der Rattennebenniere.

erfolgte an 5 μ dicken mit H.-E. gefärbten Paraffinschnitten des in Bouin fixierten Materials. Pro Tier wurden je 200 Zellkerne der äußeren Z. fasciculata bei 525facher Vergrößerung mit dem Schraubenocularmikrometer ausgemessen. Von jedem Kollektiv wurde der mittlere Kerndurchmesser und das Gesamtvolumen bestimmt.

Die mittleren Kerndurchmesser des gesamten Versuchsmaterials sind graphisch in Abb. 1 wiedergegeben. Jeder Kurvenpunkt entspricht dem Mittelwert von 200 Kernen eines Tieres. Die Tötungszeiten nach Injektion wurden aus Übersichtsgründen auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen. Die Ausgangswerte sämtlicher Versuchsgruppen sind gleich und entsprechen früher mitgeteilten Ergebnissen an normalen Ratten (KRACHT und SPAETHE). Bereits 1 Std nach Applikation von gewöhnlichem ACTH nehmen die Kerndurchmesser zu und liegen deutlich über dem Niveau der unbehandelten Kontrollen. Zum gleichen Zeitpunkt liegt die Kerngröße nach ACTH-Depot noch im Normalbereich. Hierauf steigen als direkte Folge der corticotropen Impulse die Werte in beiden Gruppen an. Dabei zeigt sich deutlich ein retardierter Stimulierungseffekt des Depot-ACTH. 8 Std nach Injektion sind die NNR in beiden Gruppen

¹ Der Chemischen Fabrik Promonta, Hamburg, danken wir für die Überlassung von Cortiphyson und Cortiphyson-Depot.

gleichartig maximal aktiviert. Die Kerndurchmesser sind zu diesem Zeitpunkt um $0,95 \mu$ größer als die des zugehörigen Kontrolltieres. Dieser Aktivitätsgrad hält sich unvermindert bis zur 24. Std, um dann beim gewöhnlichen ACTH zunächst langsam und nach dem 6. Tag steil abzufallen und sich am 10. Tag in den Normalbereich einzupendeln. Dagegen bleiben die Kerndurchmesser nach ACTH-Depot auch nach der 24. Std und zwar bis zum 6. Tag nach der Injektion erhöht, um danach ebenfalls steil abzusinken. Die Ausgangslage wird jedoch später als im Falle des gewöhnlichen ACTH erreicht; die Kerndurchmesser liegen sogar nach 14 Tagen noch über dem Normalbereich.

Die verschiedene Größe der Kerndurchmesser potenziert sich noch beim Vergleich ihrer Kernvolumina (Tab. 1). Sudanophile Substanzen

Tabelle 1. *Wirkung von ACTH und ACTH-Depot auf die Kernvolumina der Zona fasciculata der Ratte in Abhängigkeit von der Zeit.*

Zeit nach Injektion	Gesamtvolumen von je 200 Fasciculatakernen (in $\mu^3 \cdot 10^{-3}$)		
	Kontrollen	ACTH	ACTH-Depot
0 Std	183	183	183
1 „	185	209	187
2 „	184	260	225
4 „	175	275	246
8 „	182	290	292
12 „	177	280	293
24 „	182	283	288
1,5 Tg.	170	251	271
2 Tg.	191	238	283
3 „	172	237	294
4 „	180	235	269
5 „	177	224	246
6 „	187	235	277
7 „	192	197	219
8 „	187	198	209
9 „	186	205	208
10 „	190	189	218
14 „	185	186	199

waren in beiden Gruppen bis zu 36 Std p. i. eindeutig vermindert und 2 Tage nach Injektion wieder in normaler Menge vorhanden. Ein Vergleich der NN-Gewichte ergab keine verwertbaren Resultate; nach eigenen Beobachtungen können bereits größere Schwankungen bei Normaltieren bestehen.

Als wesentliches Ergebnis ist der von der Zeit abhängige Unterschied der NNR-Aktivierung nach ACTH und ACTH-Depot herauszustellen. Kurvenmäßig handelt es sich um die zeitliche Parallelverschiebung eines quantitativ etwa gleichartigen Stimulierungsgrades. Für einfaches ACTH

ist der schnelle Aktivitätsbeginn, ein verhältnismäßig kurzes Maximum und ein langsamer Abfall der NNR-Aktivität typisch. Es kann angenommen werden, daß spätestens jenseits der 24. Std nach Injektion kein aktives Hormon mehr zur Verfügung stand, um die zur Überfunktion stimulierte Rinde auf diesem Niveau zu halten. Der Fortfall des Hormonreizes bedingt die allmähliche Restitution zur Norm, die etwa am 10. Tag erreicht ist. Die Depotform weist demgegenüber eine langsamer eintretende und länger anhaltende Wirkung auf. Sie beruht einmal auf resorptionsverzögernden Eigenschaften des Gelatinemediums und zum anderen auf einer langsameren Inaktivierung des Medikaments (Retardeffekt).

Vergleicht man den Zeitfaktor im Eosinophilen-, Ascorbinsäure- und Cholesterinverarmungstest mit dem strukturellen Ablauf der Rindenstimulierung nach ACTH, so ergeben sich hinsichtlich Maximum und Normalisierung teils Übereinstimmungen, teils Abweichungen. So hat die Abnahme des Ascorbinsäuretiters in der NNR ihren Höhepunkt bereits zu einem Zeitpunkt erreicht, an dem karyometrisch gerade erste Anzeichen einer Funktionssteigerung faßbar sind. Andererseits hat sich der Ascorbinsäurespiegel auf dem Gipfel der histometrischen Strukturänderungen bereits wieder normalisiert. Das bedeutet, daß die metabolische Wirkung vor der strukturellen Anpassung einsetzt und vor ihr abgeschlossen ist. Das Maximum der Eosinopenie fällt mit dem Beginn der größten Kernschwellung zusammen (8 Std-Wert), im weiteren Verlauf steht der Normalisierung der Eosinophilenzahl bis zu 24 Std eine konstante Kernvergrößerung gegenüber. Eine größere, umgekehrt proportionale Übereinstimmung weisen Cholesteringehalt und Kerngrößenverhältnisse auf, wenn auch die Cholesterinkonzentration nach 12 Std bereits langsam wieder ansteigt.

Zur Deutung dieser Phänomene muß zwischen der Ausschüttung gespeicherter Rindensteroiden und ihrer Neusynthese unterschieden werden. ACTH bewirkt offenbar zunächst die Eliminierung gespeicherter Hormone, wofür die Abnahme sudanophiler Substanzen einen gewissen morphologischen Anhalt bietet. Die Ausschüttung ihrerseits wirkt als zusätzlicher spezifischer Reiz zur Neuproduktion. Diese Funktionssteigerung des Rindengewebes äußert sich morphologisch in einer Zell- und Kernschwellung. Mit der Kernmessung wird also lediglich der Ablauf der 2. Phase erfaßt, während der Ausfall der erwähnten Funktionsproben nur die Ansprechbarkeit des Rindengewebes auf einen ACTH-Reiz wiedergibt und zum größten Teil der Ausschüttung der gespeicherten Steroide zukommt. Auf diese Weise erklärt sich zwanglos die Diskrepanz und teilweise zeitliche Überlagerung im Ausfall der verschiedenen Testmethoden. Die zwischen der 8. und 24. Std nach ACTH-Zufuhr gleichmäßig hohe Kernschwellung erlaubt den Schluß, daß bis zu diesem

Zeitpunkt entweder noch eine aktive Hormonwirkung vorhanden ist oder aber, daß aktives Corticotropin nicht mehr zur Verfügung steht und es sich lediglich um die morphologisch faßbare Auswirkung eines abgeschlossenen corticotropen Reizes im Erfolgsorgan handelt. Für die letzte Möglichkeit sprechen Befunde über Konzentration und Verweildauer des Hormons in der NNR sowie Angaben über seine Halbwertszeit und Inaktivierung.

Nach SONENBERG u. Mitarb. reichert sich mit Radiojod markiertes ACTH bereits 30 sec und maximal zwischen 1—4 min nach intrakardialer Applikation in sämtlichen Rindenschichten an, um ebenso schnell wieder zu verschwinden. GREENSPAN u. Mitarb. stellten fest, daß die initiale Plasmakonzentration kurz nach der Injektion nur 6% des erwarteten Spiegels beträgt und in der Folge logarithmisch abfällt. Die Autoren geben die biologische Halbwertszeit von aus Schafshypophysen gewonnenem ACTH im Plasma der Ratte mit 5,5 min, RICHARDS u. SAYERS für eine aus Rattenhypophysen gewonnenen ACTH-Fraktion im Ratten-test mit 2 min an. Endogen produziertes Corticotropin soll eine noch kürzere Halbwertszeit (0,95 und 1,25 min) als zugeführtes Hormon besitzen (SYDNOR u. SAYERS). Über Verbleib und Ausscheidung des corticotropen Hormons ist wenig bekannt. GESCHWIND u. LI wiesen eine ACTH-Inaktivierung in Leber, Nieren, NN und Zwerchfell nach. RICHARDS u. SAYERS fanden nach 5 min 40% der applizierten Dosis im extracellulären Flüssigkeitsraum und 20% in den Nieren. Nach 15 min war extracelluläres ACTH nur noch in Spuren vorhanden, dagegen 15% in den Nieren, kleine Mengen in der NN, während in Leber und Urin keine Aktivität nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse sprechen übereinstimmend für eine kurzfristige Wirkungsdauer des corticotropen Hormons. Die zeitliche Diskrepanz zwischen Ascorbinsäure- und NN-Gewichtserhaltungstest veranlaßte YOUNG u. Mitarb., 2 wirksame Komponenten im Hormonmolekül anzunehmen: den Gewichts- und den Ascorbinsäurefaktor. Die quantitativ unterschiedliche Wirkung verschiedener Corticotropine in diesen Testmethoden schien hierfür beweisend zu sein. Es hat sich aber gezeigt, daß sie eher eine Folge der Resorptions- und Abbauverhältnisse verschieden molekularer Fraktionen ist, da mit zunehmender Reinigung auch eine höhere Halbwertszeit erreicht und der Schwerpunkt der Funktionsproben zum Gewichtserhaltungstest verschoben wird (WEISSBECKER).

Die Frage, ob die zwar absinkende aber noch deutlich erhöhte karyometrisch feststellbare Aktivität der Fasciculatazellen jenseits der 24. Std nach ACTH-Injektion als Zeichen einer vermehrten Funktion gelten kann, ist zu bejahen, obwohl die biologischen Funktionsproben zu diesem Zeitpunkt bereits versagen. Es ist zu berücksichtigen, daß die corticotrope Halbwertszeit gering ist, daß aber auch noch kleinste Hormonmengen zur Aufrechterhaltung einer erhöhten Funktion ausreichen. Mit dem Versiegen der Tropinwirkung fällt zunächst die erhöhte Hormonabgabe ab und wird allmählich eingestellt. Die morphologisch feststellbare Restaktivität jenseits der 24. Std nach ACTH-Gabe dürfte ihr funktionelles Äquivalent in einer Mehrproduktion haben, die vor allem zur Auffüllung der entleerten Depots dient. Während also der initialen Depotentleerung in einer 2. Phase die Mehrproduktion und Sekretion folgt, ist diese Reihenfolge beim Abklingen der Hormonwirkung

umgekehrt: die Sekretion sistiert, während die Restaktivität den zell-eigenen Depots zugute kommt.

Die Entwicklung von Depot-ACTH hat den praktischen Vorteil einer länger anhaltenden Wirkung auf die NNR. Nach WEISSBECKER genügt eine i. m. Injektion von 20—40 i. E. für eine Wirkungsdauer von 24 bis 36 Std. Mit höheren Dosen wird diese noch verlängert. Außerdem soll die Wirkung von Depot-Präparaten — gemessen am Eosinophilentest — auch verstärkt sein, so daß im Vergleich zum gewöhnlichen ACTH kleinere Dosen angewandt werden können. Mit der von uns gewählten Versuchsanordnung konnte gegenüber gewöhnlichem ACTH zwar eine deutliche Resorptionsverzögerung im Initialstadium und eine länger anhaltende maximale Stimulierung der Fasciculatazellen nachgewiesen werden, eine potenzierte Wirkung war dagegen beim Depot-ACTH nicht vorhanden (annähernd gleich hohe Gipfel beider Kurven). Dies braucht nicht unbedingt gegen eine Verstärkerwirkung des Depotpräparates zu sprechen und kann damit erklärt werden, daß bereits gewöhnliches ACTH eine maximale Kernschwellung auslöst, die von dem Depotpräparat nicht übertroffen werden kann.

Das Prinzip von Depotproteohormonen beruht allgemein darauf, die bei wäßrigen Lösungen schnell einsetzende Resorption und Inaktivierung zu verzögern. Hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Resorption im Bereich der Injektionsstelle kann beim ACTH sowohl durch Suspension in hydrophoben Medien wie Arachisöl, Äthyloleat u. a. (WOLFSON u. Mitarb.) oder durch mehr oder weniger komplexe kolloidale Lösungen (Gelatine, Polyvinylpyrrolidon) vermindert werden. Gleichzeitig werden diesen Substanzen hemmende Eigenschaften auf die enzymatische Inaktivierung zugesprochen. Antiproteolytische und hyaluronidasehemmende Prinzipien wie Polyphlorethinphosphat (HAMBURGER), phosphoryliertes Hesperidin (COHEN u. Mitarb.), d- α -Phatocopherolphosphat und Chondroitinphosphat verzögern ebenfalls die Resorption und Inaktivierung, so daß auch bei Anwendung dieser Verbindungen stärkere Wirkungen als mit gewöhnlichem ACTH beobachtet wurden (KUPPERMAN u. Mitarb.). Neuerdings werden im Hinblick auf die leichtere Anwendbarkeit Kombinationen wäßriger ACTH-Lösungen mit Zinkphosphat, Zinkhydroxyd (HOMAN u. Mitarb., FERRIMAN u. Mitarb., DEN OUDSTEN u. Mitarb., GREENE u. VAUGHAN-MORGAN) oder Zinkprotamin (HOLTERMAN u. THORSDALEN) bevorzugt. Ähnlich dem Insulin wird ACTH durch Zinksalze stabilisiert und damit eine potenzierte bzw. verzögert einsetzende Hormonwirkung sowie die Hemmung gewisser proteolytischer Fermente erreicht.

Zusammenfassung.

Ablauf und Dauer der Nebennierenrinden-Aktivierung nach einmaliger intramuskulärer Zufuhr von ACTH und ACTH-Depot werden karyometrisch in der äußeren Zona fasciculata der Ratte ausgewertet. Depot-ACTH bewirkt eine langsamer eintretende und länger anhaltende Rindenstimulierung, was auf resorptionsverzögernde und inaktivierungshemmende Eigenschaften des Gelatinemediums zurückgeführt wird. Die zeitliche Diskrepanz im Ausfall biologischer und morphologischer

Funktionsproben des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems wird unter Berücksichtigung der Konzentration und Verweildauer des ACTH in der Nebennierenrinde erörtert. Sie ist — abgesehen vom Reinheitsgrad des Hormons — in erster Linie durch den Sekretionsmechanismus des Rindenparenchyms zu erklären.

Literatur.

COHEN, H., H. H. FREEDMAN, W. KLEINBERG, M. EISLER and G. MARTIN: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 749 (1953). — FERRIMAN, D. G., A. B. ANDERSON and P. P. TURNER: Lancet **1954**, 545. — GESCHWIND, I. I., and C. H. LI: Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 226 (1952). — GREENE, R., and J. VAUGHAN-MORGAN: Lancet **1954**, 543. — GREENSPAN, F. S., C. H. LI and H. M. EVANS: Endocrinology (Springfield, Ill.) **46**, 261 (1950). — HAMBURGER, C.: Acta endocrinol. (Copenh.) **11**, 282 (1952). — HOMAN, J. D. H., G. A. OVERBECK, J. P. J. NEUTELINGS, C. J. BOOLJ and J. VAN DER VIES: Lancet **1954**, 541. — HOLTERMANN, H., and N. THORSDALEN: Acta endocrinol. (Copenh.) **12**, 81 (1953). — KRACHT, J., u. M. SPAETHE: Virchows Arch. **323**, 174 (1953). — KUPPERMANN, H. S., H. COHEN, H. H. FREEDMAN, W. KLEINBERG and E. L. WYANT: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 678 (1953). — O'DONNELL, W. M., ST. S. FAJANS and J. G. WEINBAUM: Arch. Int. Med. **88**, 28 (1951). — DEN OUDSTEN, S. A., L. VAN LEEUWEN and R. J. COERS: Lancet **1954**, 547. — RENOLD, A. E., D. JENKINS, P. H. FORSHAM and G. W. THORN: J. Clin. Endocrin. **12**, 763 (1952). — RICHARDS, J. B., and G. SAYERS: J. Clin. Endocrin. **11**, 756 (1951). — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 87 (1951). — SAYERS, G., and M. A. SAYERS: Recent Progr. in Hormone Res. **2**, 81 (1948). — Ann. New York Acad. Sci. **50**, 522 (1949). — SAYERS, G., M. A. SAYERS, E. G. FRY, A. WHITE and C. N. H. LONG: Yale J. Biol. a. Med. **16**, 361 (1944). — SAYERS, G., M. A. SAYERS, T. Y. LIANG and C. N. H. LONG: Endocrinology (Springfield, Ill.) **38**, 1 (1946). — SONENBERG, M., A. S. KESTON and W. L. MONEY: Endocrinology (Springfield, Ill.) **48**, 148 (1951). — SYDNOR, K. L., and G. SAYERS: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **83**, 729 (1953). — WEISSBECKER, L.: Probleme des Hypophysen-Nebennierenrinden-systems. S. 35. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1953. — Klinik der Nebenniereninsuffizienz und ihre Grundlagen. Stuttgart: F. Enke 1954. — WOLFSON, W. Q., R. E. THOMPSON, W. D. ROBINSON, L. F. DUFF, C. COHEN, L. LEWIS and D. HAUT: Proc. Second Clin. ACTH Conf. New York **2**, 1 (1952). — YOUNG, F. G.: Lancet **1951**, 1211. — YOUNG, F. G., and M. STACK-DUNNE: Brit. Med. J. **1951**, 1386.

Priv.-Doz. Dr. J. KRACHT, Borstel über Bad Oldesloe,
Tuberkulose-Forschungsinstitut, Institut für experimentelle Biologie und Medizin.

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena
(Direktor: Prof. Dr. med. B. ZORN).

Über die antiarthritische Wirksamkeit einiger Derivate des 2-Phenyl-4-[oxy-acetyl]-chinolins.

Von
BERNHARD ZORN und AUGUSTE MANKEL.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Januar 1954.)

Solange das eigentliche Wesen des Rheumas noch im Dunkeln liegt, wird man sich in der Hauptsache mit symptomatisch wirkenden Mitteln begnügen müssen, wobei es schon einen Gewinn bedeutet, wenn man deren Wirkung durch Veränderung ihrer chemischen Zusammensetzung vervollkommen kann. Die antirheumatische Wirkung der Steroide scheint durch die Ketolgruppierung $-\text{C}-\text{CH}_2\cdot\text{OH}$ verstärkt zu werden.

||

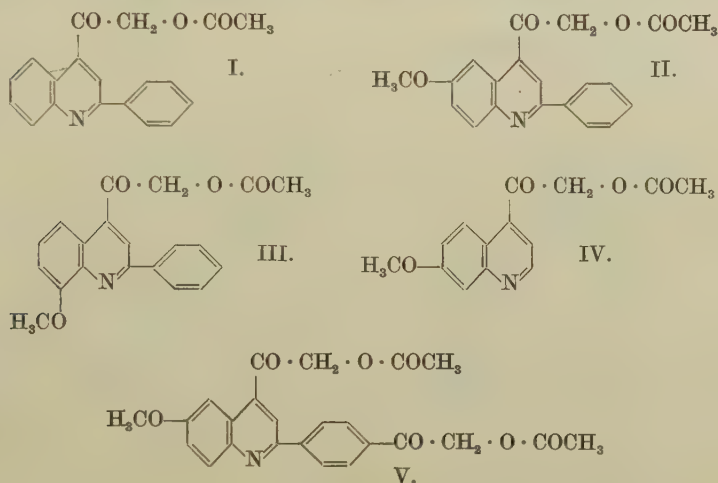
O

Auf Grund von Beobachtungen, die demnächst zusammenfassend veröffentlicht werden sollen, erschien der Versuch angebracht, in *ein-fachere* und leichter zugängliche Ringsysteme, als sie die Steroidkörper darstellen, Ketolgruppen einzuführen bzw. vorhandene Carboxylgruppen in solche Gruppierungen umzuwandeln, um dann ihre antiarthritische und entzündungsbekämpfende Wirkung im Tierversuch zu erproben. Als geeignet erwiesen sich sowohl polycyclische als auch heterocyclische Körper. Unter den letzteren wurde zunächst die 2-Phenylchinolin-carbonsäure-(4) gewählt, die als *Atophan* seit Jahrzehnten mit großem Erfolg als Gicht- und Rheumamittel Verwendung findet. Wir haben die 2-Phenylchinolin-carbonsäure-(4) und ihre entsprechenden 6-, 7- und 8-Methoxyverbindungen sowie auch die 2-Phenyl-6-Methoxychinolin-4-4'-dicarbonsäure über ihre Säurechloride mittels Diazomethan in die entsprechenden Diazoketone übergeführt, wobei wir der von ARNDT u. EISTERT für andere Carbonsäuren beschriebenen Methode gefolgt sind. Die auf diese Weise dargestellten Diazoketone wurden sodann in die entsprechenden Ketoalkohole und -acetate umgewandelt (ZORN u. Mitarb., 1954).

Von den bisher von uns synthetisch dargestellten Derivaten der 2-Phenylchinolin-carbonsäure-(4) wurden folgende Verbindungen in Form ihrer Ketoalkohol-acetate im Tierversuch geprüft:

- I. 2-Phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin.
 II. 6-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin.
 III. 8-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin.
 IV. 7-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin.
 V. 6-Methoxy-4-[acetoxy-acetyl]-2-[4-(acetoxy-acetyl)-phenyl]-chinolin.

Um eine gewisse Vergleichsgrundlage für die therapeutische Wirkung der von uns dargestellten Substanzen zu haben, wurde eine analoge Versuchsreihe mittels Atophannatrium (VI) durchgeführt. Die Dosierung wurde so gewählt, daß sie — auf Atophan umgerechnet — genau derjenigen der korrespondierenden Gruppen der übrigen Substanzen entspricht.



Methodisches.

Als Test wurde die *experimentelle Formaldehyd-Arthritis der weißen Ratte* benutzt, die im Jahre 1949 von SELYE angegeben worden ist. Das Verfahren besteht darin, daß man weißen Ratten im Gewicht von rund 200 g unter die Plantar-Aponeurose einer Hinterpfote 0,2 cm³ einer 2—3%igen wäßrigen Formaldehydlösung einspritzt und die Entwicklung einer unspezifischen Entzündung des Sprunggelenks abwartet. Die Konzentration der Formaldehydlösung, die stets frisch bereitet werden muß, ist auf gasförmigen Formaldehyd zu berechnen. Bei richtiger Technik und passender Dosierung ist das Höhestadium der Gelenkentzündung in durchschnittlich 10—12 Tagen erreicht. Der Querdurchmesser des arthritischen Gelenks dient als Maßstab für die Beurteilung und wird jeden zweiten Tag mit einem Tasterzirkel gemessen. Als Vergleich dient der Querdurchmesser des gesunden Gelenks der Gegenseite. Die Werte werden in ein Koordinatensystem eingetragen und ergeben ein eindrucksvolles Bild des Krankheitsverlaufes und der therapeutischen Wirkung des zu prüfenden Mittels (vgl. Abb. 1—6).

Die auszuwertende Substanz selbst wird in Form einer geeigneten Lösung den Versuchstieren täglich subcutan unter die Rückenhaut gespritzt. Unlösliche Mittel können mit der Schlundsonde zugeführt werden. Mit der Behandlung wird jedoch

erst begonnen, nachdem die Messungen ergeben haben, daß die Höchstwerte der Gelenkschwellung während 2–3 Tagen konstant geblieben sind; dies ist zumeist am 13.–14. Tage nach der Formaldehydeinspritzung der Fall.

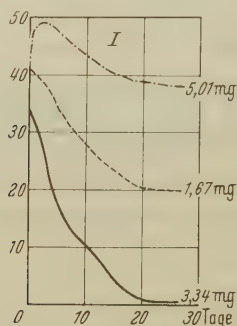


Abb. 1.

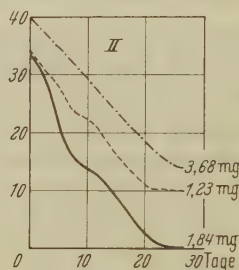


Abb. 2.

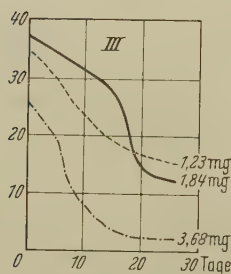


Abb. 3.

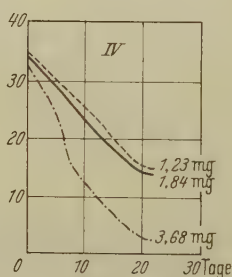


Abb. 4.

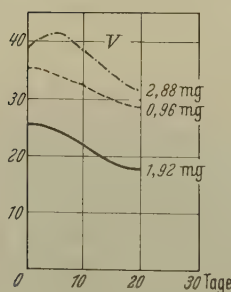


Abb. 5.

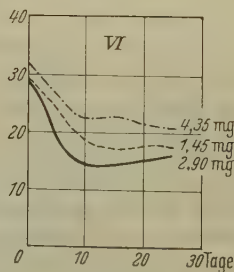


Abb. 6.

Abb. 1–6. Die Kurven veranschaulichen das Ausmaß und die Schnelligkeit der Heilwirkung, die die Substanzen I–V mit den jeweils angewendeten Dosierungen auf die Formaldehyd-Arthritis der weißen Ratte ausüben. Die Abszisse gibt die Tage vom Beginn der Therapie an, nachdem die Gelenkentzündung auf dem Höhepunkt ihrer Entwicklung angelangt ist. Jede Kurve beginnt also mit dem Zeitpunkt der maximalen Gelenkschwellung und gibt den Grad der Abschwellung während der Versuchsdauer wieder. Die Ordinate zeigt an, um wieviel Zehntelmillimeter das entzündete Gelenk im Querdurchmesser dicker ist als das entsprechende gesunde Gelenk der Gegenseite. Je mehr sich die Kurve der Abszisse nähert, desto mehr ist das arthritische Gelenk angeschwollen; je weiter sie von ihr entfernt bleibt, desto ausgeprägter ist der zurückbleibende unbeeinflusste Restzustand der Entzündung. Substanz VI = Atophannatrium zum Vergleich.

Wenn die angewendete Substanz eine antiarthritische oder entzündungsbekämpfende Wirkung besitzt, so tritt innerhalb der nächsten 3 Tage eine mehr oder weniger deutliche *Abschwellung des entzündeten Gelenks* ein, die sich je nach der Wirkungskraft der Substanz schneller oder langsamer fortsetzt, bis der normale Gelenkumfang wieder erreicht ist.

Bei unwirksamen oder schwachen Mitteln wird die Gelenkschwellung nur wenig beeinflußt und sinkt nur unbedeutend ab. Dies zu betonen ist wichtig, weil verschiedene Untersucher den Wert der Methode angezweifelt haben und auf Grund ihrer Beobachtungen zu der Meinung gekommen sind, die experimentelle Formaldehyd-Arthritis neige zu ausgesprochener Selbstheilung. Da der Wert eines Untersuchungsverfahrens allein auf seiner Zuverlässigkeit beruht, so sind wir diesen Fragen nachgegangen und haben in ausgedehnten Versuchsreihen geprüft, wie sich die Formaldehyd-Arthritis unter dem Einfluß verschiedenster Formaldehyd-Konzentrationen entwickelt und wie sie beim Fortfall jeglicher therapeutischer Beeinflussungen verläuft. Es hat sich ergeben, daß die experimentell gesetzte Gelenkschwellung bei richtiger Technik und geeigneter Dosierung mindestens einen Monat lang im wesentlichen unverändert bestehen bleibt und nur verhältnismäßig wenig zurückgeht. Selbstverständlich klingt die Gelenkentzündung nach Überwindung der akuten Reizphase eines Tages ab, wobei es entweder zu einer *Restitutio ad integrum* oder zu einem Übergang in den chronischen Entzündungszustand kommt. Sofern aber die angewendete Formaldehyd-Konzentration oberhalb 1,5% liegt und sich die Menge des eingespritzten Formaldehyds zwischen 4—6 mg bewegt, verläuft die Arthritis so heftig und anhaltend, daß sie zur Beurteilung der antiarthritischen Wirkung eines Medikamentes voll ausreicht (vgl. ZORN u. Mitarb., 1953).

Wir wollen einen Nachteil des Verfahrens nicht verschweigen: das sind die durch den Formaldehyd bedingten häufigen Nekrosen an der Haut der gespritzten Pfote oder am entzündeten Gelenk selbst. Sofern sich keine Sekundärinfektion mit Absceßbildung entwickelt, sind sie ohne wesentliche Bedeutung. Bei umfangreicheren Nekrosen müssen jedoch die Tiere aus dem Versuch herausgenommen werden.

Von jeder der oben genannten 5 Substanzen wurden je 3 verschiedene Dosierungen ausprobiert; zu jeder Dosierung wurden 3 Ratten verwendet, so daß jede Versuchsreihe 9 Tiere umfaßte. Dazu kommt noch die Kontrollreihe mit dem Atophannatrium.

Da die von uns dargestellten Verbindungen nahezu unlöslich in Wasser sind, mußten wir sie *in Olivenöl gelöst* verwenden, womit sich etwa 1% ige Lösungen herstellen ließen. Jedes Tier erhielt täglich eine subcutane Einspritzung unter die Rückenhaut, insgesamt 20 Spritzen während einer Versuchsdauer. Die Menge und Konzentration ist jeweils bei den einzelnen Substanzen angegeben. Alle Einspritzungen wurden völlig reizlos vertragen; sie verursachten den Tieren offensichtlich keine Beschwerden.

Ergebnisse.

I. 2-Phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin. Tagesdosen für Ratten pro 200 g Körpergewicht:

Gruppe 1: 0,2 cm³ ölige Lösung = 1,67 mg Substanz I.

Gruppe 2: 0,4 cm³ ölige Lösung = 3,34 mg Substanz I.

Gruppe 3: 0,6 cm³ ölige Lösung = 5,01 mg Substanz I.

Ergebnis. Während die Dosierung der Gruppe 1 nur mäßige Wirkung zeigt und die arthritische Schwellung im Verlaufe des Versuches nur um die Hälfte zurückgeht, setzt bei der mittleren Dosierung (Gruppe 2) eine sofortige Rückbildung der Entzündung ein, so daß am Ende des Versuches das kranke Gelenk seinen völlig normalen Umfang wiedererlangt hat. Bei der höchsten Dosierung (Gruppe 3) zeigt sich dagegen im Beginn der Behandlung eine deutliche Reizwirkung, indem die Gelenkschwellung noch einige Tage zunimmt, um dann in eine äußerst geringfügige Abschwellung überzugehen. Noch am Ende des Versuches bleibt eine sehr erhebliche Entzündung bestehen.

II. 6-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin. Mit Rücksicht auf die Beobachtungen beim 2-Phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin (I) wurde bei der Substanz II die Dosierung geändert. Die höchste Dosis wurde wegen der Möglichkeit einer Reizwirkung fortgelassen und dafür eine mittlere Dosis eingefügt. Außerdem mußten die Lösungen etwas stärker mit Öl verdünnt werden, weil die Substanz II eine geringere Löslichkeit als die Substanz I besitzt. Es entsprechen 0,3 cm³ der Substanzlösung II genau 0,2 cm³ der Substanzlösung I und 0,6 cm³ der Substanzlösung II dementsprechend 0,3 cm³ der Substanzlösung I.

Tagesdosen für die Ratten pro 200 g Körpergewicht:

Gruppe 1: 0,2 cm³ ölige Lösung = 1,23 mg Substanz II.

Gruppe 2: 0,3 cm³ ölige Lösung = 1,84 mg Substanz II.

Gruppe 3: 0,6 cm³ ölige Lösung = 3,68 mg Substanz II.

Ergebnis. Die geringste und die höchste Dosis (Gruppe 1 und 3) erbrachten prompte Besserung der Arthritis, aber keine Heilung; die Kurven zeigen auffallende Übereinstimmung. Die günstigste Wirkung liegt auch hier bei der *mittleren* Dosierung, welche während der Versuchsdauer zur Norm führte. Da diese Dosis nur rund die Hälfte von derjenigen der Substanz I beträgt, so ergibt sich, daß der Eintritt der Methoxygruppe in die 6-Stellung eine deutliche Verbesserung der Wirkung herbeigeführt hat.

III. 8-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin. Hier wurden die gleichen Substanzmengen wie bei der Substanz II angewendet. Dosierung wie bei II.

Ergebnis. Die geringste und die mittlere Dosis wirken zwar antiarthritisch, aber das Ausmaß der Wirkung ist unzureichend, obwohl zu Beginn der Behandlung eine deutliche Besserung zu erkennen ist. Erst

bei der höchsten Dosierung (Gruppe 3) tritt ein Heilerfolg ein, doch bleibt ein entzündlicher Restzustand zurück. Somit wirkt das Präparat III entschieden schwächer als die vorher geprüfte Substanz II.

IV. 7-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin. Auch hier wurde dieselbe Dosierung wie bei Substanz II und III verwendet.

Ergebnis. Aus dem Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß zwar eine antiarthritische Wirkung besteht, daß sie aber nur unvollkommen und daher unbefriedigend ist.

V. 6-Methoxy-4-[acetoxy-acetyl]-2-[4-(acetoxy-acetyl)-phenyl]-chinolin. Die Dosierung mußte wegen der geringen Löslichkeit der Substanz, die zum Teil durch die 2 Carbinolgruppen im Molekül bedingt ist, geändert werden.

Tagesdosen für die Ratten pro 200 g Körpergewicht:

Gruppe 1: 0,2 cm³ ölige Lösung = 0,96 mg Substanz V.

Gruppe 2: 0,4 cm³ ölige Lösung = 1,92 mg Substanz V.

Gruppe 3: 0,6 cm³ ölige Lösung = 2,88 mg Substanz V.

Ergebnis. Wie die Kurven zeigen, ist unter dem Einfluß der Substanz V keine deutliche Beeinflussung der Arthritis im Sinne einer Heilung eingetreten.

VI. Atophannatrium¹ als Vergleichssubstanz. Tagesdosen für die Ratten pro 200 g Körpergewicht:

Gruppe 1: 0,2 cm³ wäbr. Lösg. = 1,45 mg Atophan-Natrium, entspr. 1,36 mg Atoph.

Gruppe 2: 0,4 cm³ wäbr. Lösg. = 2,90 mg Atophan-Natrium, entspr. 2,72 mg Atoph.

Gruppe 3: 0,6 cm³ wäbr. Lösg. = 4,35 mg Atophan-Natrium, entspr. 4,08 mg Atoph.

Ergebnis. In der ersten Behandlungswoche nimmt bei jeder Dosierung die Schwellung der entzündeten Gelenke prompt ab. Dann aber läßt die Wirkung vollständig nach, und die Arthritis bleibt trotz regelmäßiger Fortsetzung der Einspritzungen unvermindert bestehen.

Als Vergleichsgrundlage für die vorstehenden Versuche dienten 20 Kontrolltiere, bei denen lediglich in üblicher Weise eine Formaldehyd-Arthritis erzeugt worden war. Sie blieben vollständig unbehandelt. Ein Teil von ihnen erhielt an den Tagen, an denen die Versuchstiere mit den Substanzen gespritzt wurden, die gleiche Menge reinen Olivenöls subcutan. Es zeigte sich, daß diese Öleinspritzungen nicht den geringsten Einfluß auf den Verlauf der Arthritis hatten.

Zusammenfassung.

Es wird über die antiarthritische Wirkung einiger synthetisch dargestellter Derivate des 2-Phenyl-4-[oxy-acetyl]-chinolins berichtet. Die Substanzen wurden in Form ihrer Essigsäureester in verschiedenen Dosierungen an Ratten ausgetestet, bei denen experimentell eine Formaldehyd-Arthritis erzeugt worden war. Es zeigte sich, daß dem 6-Methoxy-2-phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin (II) eine *ausgesprochen antiarthritische Wirkung* innewohnt, die zwar auch den entsprechenden 7- und

¹ Atophan (D.Z.) = Phenylchinolincarbonsäure.

8-Methoxyverbindungen (III und IV) eigen ist, aber bei diesen erst in wesentlich höherer Dosierung hervortritt. Das einfache 2-Phenyl-4-[acetoxy-acetyl]-chinolin (I) wirkt ebenfalls erst in entsprechend hoher Dosis befriedigend, führt dann aber zu völliger Heilung des entzündeten Gelenks. Als unbrauchbar erwies sich das 6-Methoxy-4-[acetoxy-acetyl]-2-[4-(acetoxy-acetyl)-phenyl]-chinolin (V). Hier ist die bei der 6-Methoxy-Verbindung (II) so stark hervortretende Heilwirkung durch die Einführung einer zweiten $-\text{CO} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe fast aufgehoben.

Das zum Vergleich herangezogene Atophannatrium zeigte in analogen Dosen unter den gewählten Versuchsbedingungen anfangs eine deutliche antiarthritische Wirkung, die aber bald nachließ und nicht zum Abklingen der Formaldehyd-Arthritis führte.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß bei den beschriebenen Chinolincarbonsäuren die Umwandlung der Carboxylgruppe in eine Ketoalkoholgruppe eine deutliche Steigerung der antiarthritischen und antiphlogistischen Wirkung bei der Formaldehyd-Arthritis der weißen Ratte bedingt.

Literatur.

- ARNDT, F., B. EISTERT u. W. PARTALE: Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 1364 (1927).
— EISTERT, B.: In „Neue Methoden der präparativen organischen Chemie“, 2. Aufl., S. 359, 399—400. Berlin: Verlag Chemie 1944. — SELYE, H.: Brit. Med. J. **1949**, II, 1129. — ZORN, B., u. AUGUSTE MANKEL: Hoppe-Seyler's Z. **296**, 239 (1954).
— ZORN, B., u. Mitarb.: Z. inn. Med. **8**, 850 (1953).

Prof. Dr. BERNHARD ZORN,
Physiol.-chem. Institut der Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. KUSCHINSKY).

Untersuchungen über die Einwirkung von verschiedenen Pharmaka auf die Spontanrhythmik des isolierten Hühneramnion**.

Von

GUSTAV KUSCHINSKY, HEINZ LÜLLMANN und ERICH MUSCHOLL.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Februar 1954.)

Die Entstehung von koordinierten Bewegungen in isolierten Organen ist in neuerer Zeit wiederholt Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

So hat BURN mit BÜLBRING, VANE und KORDIK die Spontanrhythmik von Herzen und die Bewegungen des Flimmerepithels in Beziehung zum Acetylcholin-stoffwechsel gesetzt. EVANS u. SCHILD (1953a) und KLINGE bedienten sich erneut des ganglienzellfreien Katzendarm-Präparates. Von KAWABATA wurden verschieden große Stücke der Krötenharnblase benutzt, um die Schrittmacher der Bewegung zu lokalisieren. Ein sich spontan kontrahierendes Präparat wurde von MISLIN in Form des Flughautvenenherzens der Fledermaus angegeben. GINETSINSKII, SACHS, ITINA u. SOKOLOWA demonstrierten an explantierten Skelettmuskeln von neugeborenen Kaninchen geordnete Bewegungen.

Da histologische Untersuchungen immer wieder das Fehlen nervaler Elemente in Vogelamnien ergeben haben (VERZAR, PÉTERFI, STOEHR, BAUTZMANN), wählten wir im Anschluß an BAUR und FERGUSON das Hühneramnion als Versuchsobjekt, wie gleichzeitig mit uns EVANS u. SCHILD (1953b).

Das Hühneramnion stellt also ein nervenfreies, glattmuskeliges Organ dar, das koordinierte Bewegungen ausführt, wie unter anderem physiologische Beobachtungen ergeben haben (VERZAR, PIERCE). Uns scheint dieses Objekt besonders geeignet zu sein, verschiedenen physiologischen (Entstehung der ersten Erregung, deren Weiterleitung und Koordination) und pharmakologischen Fragen (Angriffspunkt und Wirkungsweise einzelner Pharmaka) näher zu kommen.

Methodik.

Das Hühneramnion wurde nach dem Vorgehen von BAUR isoliert und in O₂-durchperlter Tyrodelösung bei 38° C aufgehängt. Die Registrierung der Kontraktionen erfolgte in isometrischer Anordnung auf optischem Wege. Die Empfindlichkeit

* Frau Prof. Dr. med. HEDWIG LANGECKER zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Über die Versuchsergebnisse wurde auf der 20. Tagung der dtsh. Pharmakologischen Gesellschaft in Bonn berichtet (LÜLLMANN).

des Systems war variabel so eingestellt, daß die Spannungsentwicklung von 50—300 mg jeweils zu maximalen Ausschlägen führte. In Abhängigkeit vom Bebrütungsalter entwickelten die isolierten Amnien die genannten Spannungen.

Aus zwei Gründen erwiesen sich die Amnien im Bebrütungsalter vom 7. bis zum 9. Tage als günstigste Versuchsobjekte: a) Es besteht eine ausgesprochene Neigung zu rhythmischen Reaktionen, die in den folgenden Bebrütungstagen von einem mehr tonischen Verhalten abgelöst wird. b) Mit zunehmendem Alter wächst die gefäßführende Allantois über immer größere Anteile des Amnions und läßt sich präparativ nicht mehr von diesen trennen.

Die Ableitung der Aktionspotentiale vom isolierten Amnion erfolgte durch eine Pinselelektrode über eine Silber-Silberchloridverbindung. Zur Registrierung der Potentiale diente ein Tectronix-Oszillograph (Typ 512), dem in den meisten Fällen zwei Philips-Vorverstärker GM 4570 (gelegentlich genügte ein Vorverstärker) vorgeschaltet waren. Die Zeitauflösung des Oszillogramms erfolgte durch ein Filmgerät.

Die Messung der Cholinesteraseaktivität im Amniongewebe wurde mit der mikromanometrischen Methode nach LINDERSTRÖM-LANG u. HOLTER vorgenommen. Der Fermentansatz, mit dem die „Taucher“ beschickt wurden, hatte folgende Zusammensetzung:

20 mg Amnion (Feuchtgewicht); 20 mm³ Bicarbonatpuffer (NaCl 0,72%, KCl 0,018%, CaCl₂ 0,028%, NaHCO₃ 0,2%); 20 mm³ 1% Substrat (Acetylcholinhydrochlorid¹, Benzoylcholinhydrochlorid¹, Acetyl- β -methylcholinhydrochlorid¹) in Bicarbonatpuffer.

V Versuchsergebnisse.

1. *Die Wirkung erregender Substanzen.* Acetylcholin, Nicotin, Bariumchlorid und Histamin wurden untersucht. Wir beobachteten eine Auslösung der Rhythmik bei ruhendem Amnion, eine Frequenzsteigerung der Spontanbewegungen oder eine Tonussteigerung bei folgenden Konzentrationen: Acetylcholinhydrochlorid 1:20 000—1:500 000, Nicotintartrat 1:20 000—1:200 000, Bariumchlorid 1:2000—1:200 000 und Histaminhydrochlorid 1:20 000—1:600 000. Je nach Bebrütungsalter reagierte das Organ mehr rhythmisch (7.—9. Tag) oder tonisch (9.—12. Tag). Bei Vergleich der Wirkungen der einzelnen erregenden Substanzen untereinander ergab sich der Eindruck, daß bei der Bariumwirkung die Beeinflussung des Rhythmus, bei dem Acetylcholineffekt die des Tonus überwog. Während sich Acetylcholin, Nicotin und Histamin als leicht auswaschbar erwiesen, zeigten die Bariumionen eine nachhaltigere Wirkung. Erwähnt werden mag die Unwirksamkeit von Hypophysenhinterlappenhormon.

2. *Die Beeinflußbarkeit der Kontraktionen.* Die Acetylcholinhemmstoffe d-Tubocurarin (1:10 000—1:20 000), Decamethoniumjodid (1:2000) und Atropinsulfat (1:20 000) wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, am nicht spontan arbeitenden Amnion Effekte auszuüben. Eine Eigenwirkung konnte bei den angegebenen Konzentrationen nicht festgestellt

¹ Wir danken den Firmen Hoffmann-La Roche, Grenzach, und E. Merck, Darmstadt, für die freundliche Überlassung der Versuchsmengen.

werden. Ebenso waren diese Verbindungen nicht in der Lage, die durch Acetylcholin oder Bariumionen ausgelösten Kontraktionen zu unterdrücken oder abzuschwächen (Abb. 1). Dasselbe Verhalten zeigten die beiden bevorzugt an Ganglien angreifenden Substanzen Pentamethoniumjodid (1:2000) und Hexamethoniumjodid (1:2000).

Dagegen erwiesen sich Papaverin und Chinin als starke Inhibitoren. Die salzsauren Salze konnten in Konzentrationen von 1:10000 bis 1:200000 die durch Acetylcholin oder Barium angeregten rhythmischen

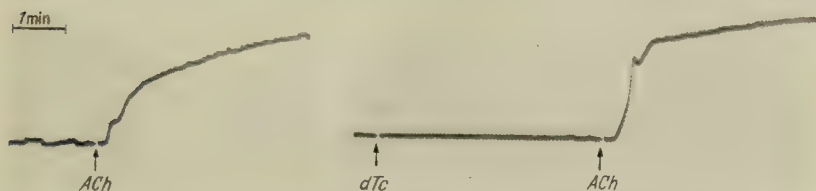


Abb. 1. Isoliertes Hühneramnion, 12 Tage bebrütet, isometrische Registrierung.
ACh = Acetylcholin 1:20000; dTc = d-Tubocurarin 1:20000.

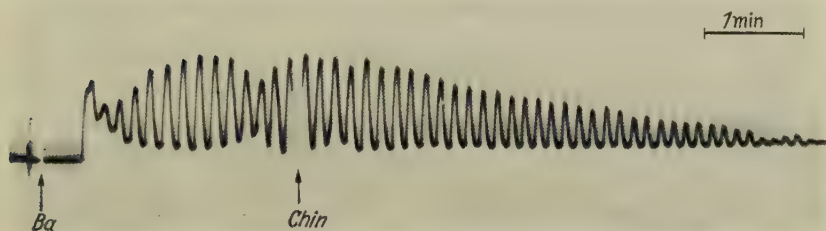


Abb. 2. Isoliertes Hühneramnion, 8 Tage bebrütet, isometrische Registrierung.
Ba = Bariumchlorid 1:20000; Chin = Chininum hydrochloric. 1:20000.

Kontraktionen hemmen (Abb. 2). Wurden zuerst Papaverin oder Chinin dem Organbad zugesetzt und darauf Barium, Histamin oder Acetylcholin, so war die Wirkung der erregenden Substanzen völlig aufgehoben. Auffallend war dabei die gute Auswaschbarkeit der Alkaloide, schon nach einem einmaligen Badwechsel war die Ansprechbarkeit des Amnion gegenüber Acetylcholin oder Barium wieder hergestellt bzw. die Spontanrhythmik setzte wieder ein.

3. *Ableitung der Aktionspotentiale.* Der Versuch, vom Amnionmuskel elektrische Erscheinungen während der Tätigkeit abzuleiten, führte zu folgendem Ergebnis: Synchron zu den Kontraktionen konnten Aktionspotentiale aufgezeichnet werden, deren Dauer nur einen Bruchteil der Kontraktionszeit ausmachte (Abb. 3). Zeitlich fiel das Auftreten vor oder in den Beginn der Muskelverkürzung in Abhängigkeit von der Lage der Elektrode. Wurde von der Stelle abgegriffen, von der die Kontraktionen

ihren Anfang nahmen, so lag das Aktionspotential vor den mechanischen Änderungen, berührte die Elektrode eine von diesem „Schrittmacher“ entfernte Muskelpartie, so setzte die Verkürzung schon ein, ehe die Erregung die Ableitstelle erreicht hatte. Über die Lokalisation des „Schrittmachers“ können wir keine Angaben machen, da wir bisher lediglich an dem von BAUR angegebenen Präparat gearbeitet haben.

Bei Ableitung der Aktionspotentiale von Amnien, die unter Wirkung von Acetylcholin, Nicotin oder kleinen Dosen Bariumchlorid standen, zeigten die Potentiale eine große Regelmäßigkeit, die völlig parallel zum

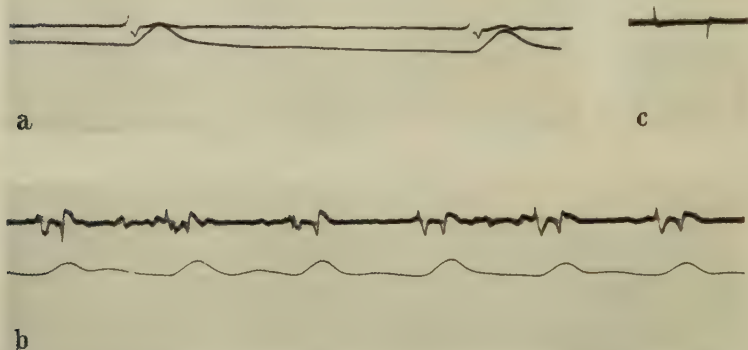


Abb. 3. Isoliertes Hühneramnion, 9 Tage bebrütet, gleichzeitige Registrierung der Aktionspotentiale und der Spannungsentwicklung. Zeitschreibung 1 sec. *a* Spontanrhythmik, obere Kurve: Oszillogramm, untere Kurve: Mechanogramm; *b* Rhythmische Kontraktionen, angeregt durch BaCl_2 1:20000, obere Kurve: Oszillogramm, untere Kurve: Mechanogramm; *c* Eichzacken des Oszillogramms entsprechen 0,1 mV.

Mechanogramm verlief. Nach Zusatz größerer Dosen Bariumchlorid (1:2000—1:21000) wurden sie unregelmäßig, nahmen an zeitlicher Dauer zu und waren nicht eindeutig dem mechanischen Geschehen zuzuordnen. Diese Koordinationsstörung war ebenso wie dem elektrischen auch dem mechanischen Bild zu entnehmen.

4. *Messung der Cholinesteraseaktivität.* Zur Klärung der Frage, ob das Amniongewebe eine Cholinesterase enthält, versetzten wir das lebendfrische Amnion in manometrischer Technik mit den Substraten Acetylcholin, Benzoylcholin und Acetyl- β -methylcholin. Während Acetylcholin und Acetyl- β -methylcholin etwa in gleichen Ausmaßen hydrolysiert wurden, konnte die im Amniongewebe vorhandene Esterase das Benzoylcholin nicht spalten. Definitionsgemäß (AUGUSTINSSON und NACHMANSON) muß es sich also um die Acetylcholinesterase (echte Esterase) handeln.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Bei der Untersuchung der erregenden Substanzen fiel uns ein gewisser qualitativer Unterschied zwischen Acetylcholin und Bariumionen in bezug auf Tonus und Rhythmus des Amnion auf. Durch Auswertung der Aufnahmen der Muskelaktionspotentiale konnte gezeigt werden, daß Barium die sonst immer vorhandene Koordination stört. Die Erregbarkeit der Muskulatur scheint stark anzusteigen, und damit kommt es zum Auftreten neuer Reizentstehungsorte, von denen aus dann ebenfalls Erregungswellen über die Muskulatur laufen. Dies würde durchaus mit den Befunden von LORENTE DE NÓ und FENG, die am Nerven erhoben wurden, in Einklang stehen.

Die Prüfung der Acetylcholinhemmstoffe d-Tubocurarin, Decamethonium und Atropin ergab den bemerkenswerten Befund, daß weder d-Tubocurarin bzw. Decamethonium noch Atropin in der Lage waren, den Acetylcholineffekt zu unterdrücken. Wir sehen dies als pharmakologischen Hinweis für die Abwesenheit von Bauelementen im Amnion an, die der „Nerv-Muskelverbindung“ entsprechen. Auch die Unwirksamkeit von Pentamethonium und Hexamethonium spricht für das Fehlen zumindest komplizierterer nervaler Elemente (intramurale Umschaltstellen).

Die Alkaloide Chinin und Papaverin unterdrückten die Wirkung aller erregenden Substanzen. Als Angriffspunkt muß wohl die Muskelzelle selbst angenommen werden. Hervorgehoben werden kann die leichte Auswaschbarkeit auch des Chinins; eine „irreversible Protoplasmaschädigung“ ist also nicht zu beobachten. Ob zwischen der negativ dromotropen und bathmotropen Wirkung des Chinins bzw. Chinidins und dem Befund am rhythmisch sich kontrahierenden Amnion Beziehungen bestehen, kann erwogen werden.

Da der Nachweis von Acetylcholinesterase im Amnion gelang, ist hiermit ein neues Beispiel für das Vorkommen dieser Esterase in einem Organ gegeben, das frei von nervalen Elementen ist. Von KORDIK, BÜLBRING und BURN konnte dies bereits für das Flimmerepithel gezeigt werden.

Zusammenfassung.

1. Das isolierte Hühneramnion nach BAUR eignet sich gut, um Fragen nach der Entstehung der Erregung, deren Weiterleitung und Koordination, dem Angriffspunkt und der Wirkungsweise von Pharmaka zu prüfen, da es sich um ein nervenfreies, rhythmische Kontraktionen ausführendes Organ handelt, das präparativ leicht zu handhaben ist.

2. Auf die erregende Wirkung von Acetylcholin, Nicotin und Bariumionen sind d-Tubocurarin, Decamethonium, Atropin, Hexamethonium und Pentamethonium ohne Einfluß.

3. Papaverin und Chinin hemmen die genannten erregenden Verbindungen reversibel.

4. Bariumionen führen zu Störungen in der Regelmäßigkeit der rhythmischen Kontraktionen. Die Deutung dieses Effektes wird in der Steigerung der Erregbarkeit und dem Auftreten neuer „Schrittmacher“ gesehen.

5. Im Amniongewebe ist Acetylcholinesterase vorhanden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur.

- AUGUSTINSSON, K. B., and D. NACHMANSOHN: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 98 (1949). — BAUTZMANN, H.: Verh. anat. Ges. 51. Vers. Erg.Bd. Anat. Anz. **100**, 135 (1953). — BAUR, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **134**, 49 (1928). — BÜLBRING, E., and J. H. BURN: J. of Physiol. **108**, 45P (1949). — Nature (Lond.) **163**, 172 (1949). — J. Physiol. **108**, 6P (1949); **108**, 508 (1949). — BÜLBRING, E., J. H. BURN and P. KORDIK: J. Physiol. **115**, 39P (1951). — BURN, J. H., and J. R. VANE: J. of Physiol. **108**, 104 (1949). — EVANS, D. H. L., and E. O. SCHILD: J. of Physiol. **119**, 376 (1953a); **122**, 63P (1953b). — FERGUSON, J.: Amer. J. Physiol. **131**, 524 (1940). — GINETSKII, A. G., M. G. SACHS, N. A. ITINKA u. M. M. SOKOLOVA: Fiziol. Z. **36**, 69 (1950). — HOLTER, H.: C. r. Trav. Labor. Carlsberg, Sér. chim. **24**, 400 (1943). — KAWABATA, G.: Jap. J. Physiol. **1**, 233 (1951). — KLINGE, F. W.: Amer. J. Physiol. **164**, 284 (1951). — KORDIK, P., E. BÜLBRING and J. H. BURN: Brit. J. Pharmacol. **7**, 67 (1952). — LINDERSTRÖM-LANG, K.: C. r. Trav. Labor. Carlsberg, Sér. chim. **24**, 334 (1943). — LORENTE DE NÓ, R., and T. P. FENG: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **28**, 397 (1946). — LÜLLMANN, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. (im Druck). — MISLIN, H.: Helvet. physiol. Acta **5**, 3C (1947). — PÉTERFI, T.: Anat. Anz. **45**, 161 (1913). — PIERCE, M. E.: J. of Exper. Zool. **65**, 443 (1933). — STOEHR, PH.: zit. nach BAUR, M. — VERZAR, F.: Pflügers Arch. **158**, 419 (1941).

Prof. Dr. G. KUSCHINSKY, Mainz, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg im Breisgau
(Direktor: Prof. Dr. L. HEILMEYER).

Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens.

II. Mitteilung.

Tierexperimentelle Untersuchungen über Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber und Milz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Von

W. KEIDERLING, F. WÖHLER und H. ALTMAYER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juni 1954.)

Durch die Methodik der quantitativen Bestimmung des Ferritins, welche in einer vorausgehenden Mitteilung beschrieben wurde (W. KEIDERLING u. F. WÖHLER), sind neue Einblicksmöglichkeiten in einen Sektor des Eisenstoffwechsels gewonnen worden, welcher als Eisenreserve des Organismus eine zentrale Stellung im Stoffwechsel einnimmt, einer quantitativen Analyse aus methodischen Gründen bisher aber nur wenig zugänglich war. Durch Ermittlung des Gesamteisengehaltes in den verschiedenen Speicherorganen waren lediglich gröbere Orientierungsmöglichkeiten gegeben.

Infolge unkontrollierbarer Beimengungen anderer Eisenproteinverbindungen wie z. B. des Hämoglobin- und Zellhämineisens mußten ihre Ergebnisse aber von vornherein von zweifelhaftem Wert erscheinen. Von verschiedenen Autoren ist deshalb versucht worden, die Speicherorgane durch Viviperfusion der Versuchstiere mittels eisenfreier Tyrode- (K. H. SCHÄFER) oder LOCKEScher Lösung (M. E. AUSTONI, A. RABINOWITSCH, D. M. GREENBERG) hämoglobinfrei zu machen. Diese Prozedur ist insbesondere für die Durchführung größerer Versuchsreihen technisch schwierig und zeitraubend, auch wird das Zellhämineisen dabei nicht mit entfernt.

Über die Verteilung der wichtigen Reserveeisenfraktion und über die ferrokinetischen Vorgänge bei den verschiedenen Störungen im Eisenstoffwechsel sind wir deshalb noch relativ wenig unterrichtet. Nach Ausarbeitung geeigneter Methodik haben wir die Veränderungen im Speichereisen von Leber und Milz an einem größeren klinischen Beobachtungsmaterial studiert, welches sich aus verschiedenen Krankheitsbildern und -gruppen zusammensetzt. Die Untersuchungen erstreckten sich nicht allein auf bioptisch und postmortal gewonnenes Punktionsmaterial der Leber, sondern wurden auch auf autoptisch entnommene Gewebestücke von Leber und Milz ausgedehnt, wobei jeweils Ferritin- und Hämosideringehalt ermittelt wurden. Über diese Ergebnisse soll an anderer Stelle berichtet werden (L. HEILMEYER, F. WÖHLER u. W. KEIDERLING).

Die Erfahrung in der Eisenstoffwechselforschung hat gezeigt, daß an der Pathogenese der verschiedenen Störungen stets mehrere Faktoren

ursächlich beteiligt sind. Es erschien deshalb angezeigt, die klinischen Untersuchungen noch durch das Tierexperiment unter Einhaltung klarer und leicht überblickbarer Versuchsbedingungen zu ergänzen, um die Grundlagen für die Deutung der klinischen Ergebnisse zu schaffen. Hier wird über die Ergebnisse bei denjenigen Störungen des Eisenstoffwechsels berichtet, welche im Zustande hochgradigen Eisenmangels, bei gesteigertem Bluterfall, exogener Eisenüberladung, bei Abwehrvorgängen und bei schweren Leberparenchymschädigungen angetroffen werden.

Material und Methodik.

Versuchstiere. Auf Grund der relativ hohen Empfindlichkeit der Ferritinbestimmung konnten für die Durchführung der Untersuchungen auch kleinere Laboratoriumstiere herangezogen werden. Bei der Auswahl entschieden wir uns nach Vorversuchen, welche an einer größeren Anzahl von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten durchgeführt wurden, für die Ratte, um durch Einsatz größerer Versuchsgruppen eine breitere Basis zu gewinnen. Für die Untersuchungen dienten insgesamt 60 Albinoratten aus einem gesunden Inzuchtstamm.

Die Tiere erhielten während der 4—8 wöchigen Quarantäne und während der Versuchsdauer eine einheitliche Diät, welche aus Körnern und Brot bestand. Eine Auswahl hinsichtlich des Körpergewichts wurde in den verschiedenen Versuchsgruppen nicht getroffen, es schwankte zwischen 85 und 325 g. Für die Ermittlung der Normalwerte im Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber und Milz wurde eine Gruppe von 20 Tieren gebildet, während die einzelnen Versuche jeweils an Fünfergruppen angestellt wurden. Alle Eingriffe und Injektionen wurden grundsätzlich in Narkose mit Äther pro narcosi durchgeführt.

Quantitative Bestimmung des Ferritins.

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung des Ferritins vgl. W. KEIDERLING u. F. WÖHLER: Ferritin wird aus frisch homogenisiertem Organewebe durch geeignete Fraktionierungs- und elektrophoretische Trennverfahren abgetrennt. Nach Anfärbung zweier Elektrophoresestreifen mit Amido-Schwarz und Kaliumferrocyanid kann der Apoferritingehalt und der Ferritineisengehalt photoelektrisch im Elphorgerät bestimmt werden. Aus den Ablesungswerten lassen sich der absolute und der prozentuale Ferritingehalt in den jeweiligen Organen berechnen.

Semiquantitative Bestimmung des Hämosideringehaltes.

Hämosiderin wurde in Paraffinschnitten von Leber und Milz histochemisch mittels der Turnbullblaureaktion nach J. TIRMANN u. W. SCHMELZER in der Modifikation nach W. HUECK bestimmt. Um den jeweiligen Grad der eingetretenen Eisenablagerung zu kennzeichnen wurden folgende Bewertungen gewählt:

Keine Eisenablagerung: —; geringe Eisenablagerung: (+); mittlere Eisenablagerung: ++; starke Eisenablagerung: +++; sehr starke Eisenablagerung: ++++; massivste Eisenablagerung: +++++.

Untersuchungsergebnisse.

I. Ferritin- und Hämosideringehalt in Leber und Milz beim Normaltier.

Die Ergebnisse an 20 normalen Albinoratten sind in Tab. 1 dargestellt. Das Körpergewicht schwankte zwischen 150 und 325 (Mittel

Tabelle 1. Normaler Ferritin- und Hämosideringehalt in Leber und Milz bei der Ratte.

Nr.	Körper- gewicht (g)	Leber				Milz			
		Organ- gewicht (g)	Ferritin		Hämo- siderin	Organ- gewicht (g)	Ferritin		Hämo- siderin
			abs. (mg)	mg%			abs. (mg)	mg%	
				Fe-Gehalt %				Fe-Gehalt %	
1	200	8,5	3,00	35,3	26,7	1,5	1,0	66,7	25,0
2	150	7,5	1,85	24,7	21,6	1,5	0,8	53,3	25,0
3	160	8,0	1,30	16,3	26,9	1,3	1,0	76,9	20,0
4	200	9,0	3,70	41,1	27,0	1,5	0,9	60,0	22,2
5	220	9,5	1,40	14,8	25,0	1,5	0,8	53,3	25,0
6	260	10,0	1,80	18,0	25,0	1,8	0,9	50,0	24,4
7	240	8,5	1,90	22,4	24,2	1,5	0,5	33,3	24,0
8	200	6,9	1,30	18,8	29,2	0,6	0,3	50,0	26,7
9	250	9,2	1,90	20,7	23,7	1,6	0,8	50,0	21,3
10	200	9,0	1,50	16,7	23,3	1,0	0,9	90,0	20,0
11	225	6,9	2,10	30,4	27,6	0,7	0,8	114,3	21,3
12	255	7,0	1,30	18,6	25,4	0,9	0,7	77,8	25,7
13	325	5,4	1,60	29,6	22,5	0,9	0,5	55,6	28,0
14	220	6,4	1,40	21,9	26,4	0,8	0,5	62,5	24,0
15	300	13,2	2,10	15,9	26,2	0,9	0,5	55,6	26,0
16	180	5,6	1,80	32,1	23,3	0,9	0,6	66,7	26,7
17	260	6,7	1,80	26,9	24,4	1,2	0,7	58,3	27,1
18	220	6,3	1,55	24,6	28,4	1,1	0,7	63,6	25,7
19	220	7,2	1,45	20,1	28,3	1,3	0,7	53,8	21,4
20	175	6,0	1,60	26,7	23,8	0,8	0,7	87,5	27,1
Mittel	223	7,8	1,92	23,8	25,4	1,2	0,7	64,0	24,3
$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$	—	—	$\pm 0,59$	$\pm 6,9$	—	—	$\pm 0,18$	$\pm 17,6$	—
$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$	—	—	$\pm 0,13$	$\pm 1,54$	—	—	$\pm 0,04$	$\pm 3,94$	—

Σd²*

223) g; das Lebergewicht zwischen 5,4 und 13,2 g. Aus den ermittelten Apoferritin- und Ferritineisenwerten wurden der absolute Ferritingehalt in mg pro Gesamtorgan wie auch der prozentuale Ferritingehalt in mg% berechnet. Der absolute Ferritingehalt der Leber schwankte zwischen

1,2 und 3,7 mg. Die Konzentration pro 100 g Leber schwankte zwischen 14,8 und 41,1 mg%.

Die in der Tabelle verzeichneten Mittelwerte der absoluten wie auch der prozentualen Ferritinkonzentration konnten statistisch gesichert werden (vgl. mittlere quadratische Abweichung und Fehler des Mittelwertes).

Aus den Werten des absoluten Ferritin- und des Ferritineisengehaltes konnte der prozentuale Eisengehalt des Leberferritins berechnet werden. Er schwankte zwischen 21,6 und 29,2 (Mittel 25,4) %. Hämosiderin war in der Leber der Normaltiere mit der Turnbullblaureaktion nicht nachweisbar.

Die Gewichte der Milz schwankten zwischen 0,6 und 1,8 g, der absolute Ferritingehalt zwischen 0,3 und 1,0 mg. Die Ferritinkonzentration wies mit Werten zwischen 33,3 und 114,3 und dem Mittel von 64 mg% im Vergleich zur Leber einen viel höheren Ferritingehalt auf. Auch hier wurden die Ergebnisse statistisch gesichert.

Der prozentuale Eisengehalt des Milzferritins schwankte zwischen 20 und 28 (Mittel 24,3) %. Die Turnbullblaureaktion war in der Milzpulpa regelmäßig schwach positiv.

Zusammenfassend läßt sich demnach feststellen, daß der Ferritingehalt in Leber und Milz der normalen Ratte von Tier zu Tier nur relativ geringe Schwankungen aufweist. Der absolute Ferritingehalt der Leber ist natürlich wegen ihres höheren Organgewichts um das 3—4fache höher als in der Milz. Prozentisch ist jedoch die Ferritinkonzentration der Milz höher und kann mehr als das Doppelte der Leberwerte betragen.

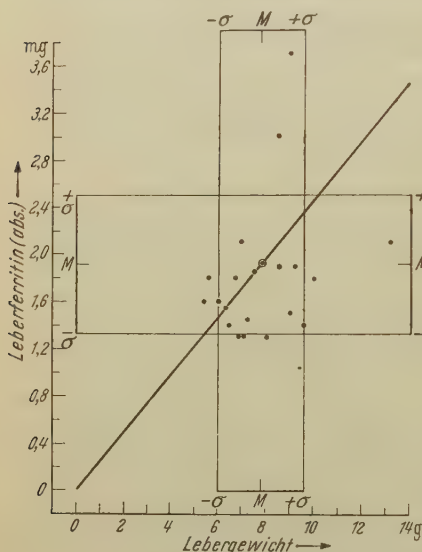


Abb. 1a.

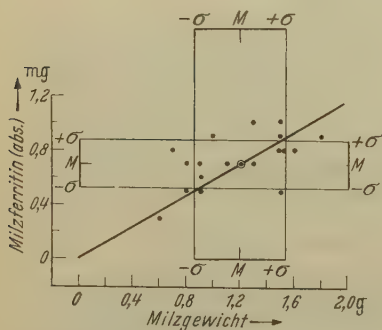


Abb. 1b.

Abb. 1a und b. Beziehung zwischen Ferritin- und Organgewicht bei der normalen Ratte.

Sichere Beziehungen zwischen absolutem Ferritingehalt und Organgewicht ließen sich für Leber und Milz in der Gruppe der Normaltiere nicht feststellen, wie aus Abb. 1a und b hervorgeht. In den Abbildungen wurden die Werte des absoluten Ferritingehalts von Leber und Milz in der Ordinate und die Werte der entsprechenden Organgewichte in der Abszisse eingetragen. Außerdem sind die Mittelwerte mit der mittleren quadratischen Abweichung angegeben.

II. Ferritin- und Hämosideringehalt in Leber und Milz unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Von Interesse erschien das Verhalten des Ferritins bei Störungen der Blutbildungsvorgänge durch Entzug einer größeren Blutmenge, durch

Ferritingehalt pro 100 g Organgewicht in Rattenleber und Rattenmilz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

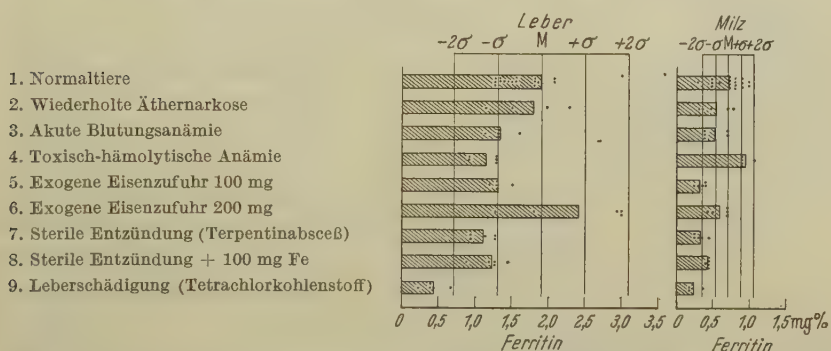


Abb. 2. Ferritin- und Hämosideringehalt von Rattenleber und Rattenmilz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Einverleibung eines Blutgiftes sowie bei Eisenüberladung durch parenterale Verabreichung hoher Eisendosen. Schließlich sollte das Verhalten des Ferritins beim Infekt wie auch bei akuter Parenchymschädigung der Leber untersucht werden.

Der Einfluß der Narkose auf den Ferritin- und Hämosideringehalt von Leber und Milz wurde an einer besonderen Tiergruppe untersucht.

Alle Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Abb. 2 den bei den Normaltieren erhaltenen gegenübergestellt. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Mittelwerte des Körpergewichtes und der Leber- und Milzgewichte sowie die Ergebnisse des Hämosiderinnachweises zusammengestellt.

In Abb. 3a und b wurden die Mittelwerte der Organgewichte in der Ordinate und die Mittelwerte der Körpergewichte in der Abszisse eingetragen. Unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen nimmt der Quotient von Organ- zu Körpergewicht mehr oder weniger zu. Am

deutlichsten sind die Veränderungen in der Leber, wo in allen Versuchsgruppen, besonders aber bei den Absceßtieren ein deutlicher Gewichtszuwachs eingetreten ist. Weniger einheitlich sind die Abweichungen in der Milz, wo in der Gruppe der Anämie- und der Tetrachlorkohlenstofftiere ein praktisch

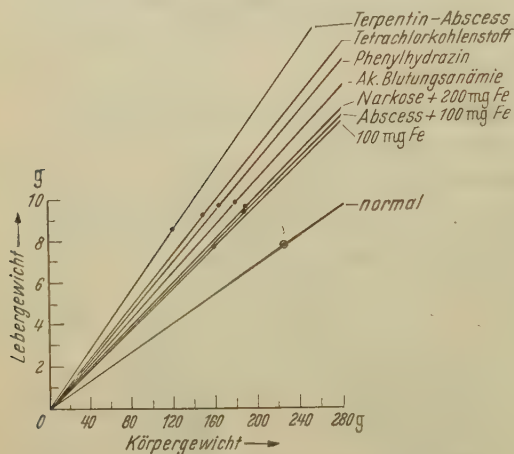


Abb. 3a.

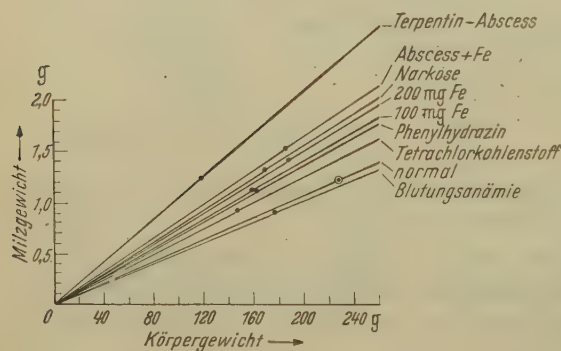


Abb. 3b.

Abb. 3a und b. Beziehungen zwischen Organ- und Körpergewicht.

normaler Quotient vorliegt und nur bei den Absceßtieren wiederum eine stärkere Erhöhung hervortritt.

Auf der rechten Seite von Abb. 2 sind die Mittelwerte des absoluten Ferritingehaltes von Leber und Milz in Form von Säulen dargestellt. Zur Kennzeichnung der Streuung der Einzelwerte und zur leichteren Beurteilung der von der Norm eingetretenen Abweichungen sind außerdem die in der Normalgruppe gefundenen Mittelwerte angegeben.

1. *Einfluß wiederholter Äthernarkose.* Über den Einfluß der Narkose unterrichten die in Gruppe 2 eingetragenen Daten. Die 5 Versuchstiere wurden innerhalb eines Zeitraumes von 9 Tagen 5mal einer Äthernarkose von je 5 min Dauer unterworfen und

am 9. Tage bei der letzten Narkose durch Eröffnung der Bauchschlagader und Pfortader getötet. Das mittlere Körpergewicht der Narkosegruppe war gegenüber der Normalgruppe herabgesetzt, während die mittleren Organgewichte von Leber und Milz erhöht waren. Die Mittelwerte des absoluten Ferritingehaltes waren in Leber und Milz herabgesetzt, befanden sich jedoch noch innerhalb der einfachen Standardabweichung der Normalgruppe. Noch deutlicher kommen die Veränderungen in der Ferritinkonzentration zum Ausdruck, welche in Abb. 4 dargestellt sind.

Sie ist in der Milz stärker als in der Leber herabgesetzt. Doch weisen die Einzelwerte des Milzferritins stärkere Streuungen auf.

Überraschenderweise ergab die Turnbullblaureaktion bei allen Narosetieren eine deutlich vermehrte Eisenablagerung in der Milz. In der

*Ferritin- und Hämosideringehalt in Rattenleber und Rattenmilz
unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.*

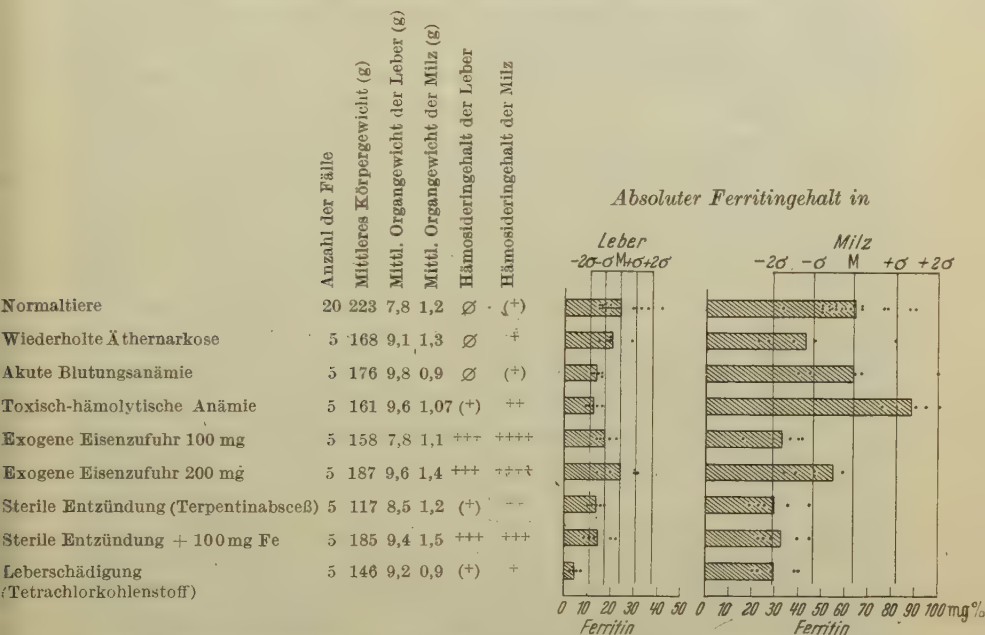


Abb. 4. Ferritinkonzentration von Rattenleber und Rattenmilz unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Leber hingegen war Eisen histochemisch nicht nachweisbar. Unter Einwirkung wiederholter Äthernarkosen sind demnach gewisse, wenn auch geringfügige Veränderungen im Ferritingehalt von Leber und Milz eingetreten.

2. Akuter Eisenmangel. Im Hinblick auf die eminente Bedeutung, welche der Speichereisenfraktion für die Blutneubildung zukommt, wurde der Einfluß einer akuten Blutungsanämie studiert.

Einer Fünfergruppe von Albinoratten wurden durch Eröffnung der Vena jugularis 3—5 cm³ Blut entnommen. Nach der Blutentnahme wurde die Wunde unter Abbindung der Jugularvene durch Naht verschlossen. Der Eingriff wurde unter Penicillinschutz durchgeführt, nämlich 40000 I.E. Penicillin G „Höchst“, subcutan und Penicillinpulver lokal in die Wunde verabreicht. Vor und 5 Tage nach Blutentnahme wurde der Hämoglobingehalt im Sahli-Hämometer bestimmt.

Die mittleren Hämoglobinwerte fielen von 17 auf 7,6 g%, d. h. um 55% ab. Das mittlere Lebergewicht war gegenüber der Normalgruppe

deutlich erhöht, während das Milzgewicht herabgesetzt war. Abweichungen vom Normalverhalten waren im Hämosideringehalt von Leber und Milz nicht nachweisbar. Die Mittelwerte des absoluten Ferritingehaltes waren deutlich herabgesetzt und lagen für beide Organe an der unteren Grenze der einfachen Standardabweichung der Normalgruppe.

Vergleicht man die Veränderungen der Ferritinkonzentration (Abb. 4), so findet man in Milzferritin eine starke Streuung der Einzelwerte, woraus ein normaler Mittelwert resultiert. In der Leber hingegen ist die Herabsetzung der Einzelwerte sehr uniform, und der Mittelwert liegt weit außerhalb der einfachen Standardabweichung der Normalgruppe.

3. *Gesteigerter Blutzerfall.* Im Gegensatz zur akuten Blutungsanämie tritt bei gesteigerter Hämolyse durch Einverleibung eines Blutgiftes eine Verminderung des Gesamteisens und Eiweißbestandes nicht ein. Einer Fünfergruppe von Albinoratten wurden an 2 aufeinanderfolgenden Tagen 25 mg/kg und am 3. Tage 12,5 mg/kg Phenylhydrazin subcutan appliziert. Am 4. Tage nach Beginn der Phenylhydrazinbehandlung wurden die Tiere in der oben beschriebenen Weise getötet. Die mittleren Hämoglobinwerte der 5 Tiere fielen von 15,5 auf 7,4 g%, d. h. um über 52% ab. Das mittlere Lebergewicht war gegenüber der Normalgruppe vergrößert, während das Milzgewicht etwas herabgesetzt war. Hämosiderin war in Leber und Milz vermehrt nachweisbar. Der absolute Ferritingehalt der Leber (Abb. 2) wie auch die Ferritinkonzentration (Abb. 4) waren stark herabgesetzt. Die Mittel- und Einzelwerte lagen ausnahmslos außerhalb der einfachen Standardabweichung der Normalgruppe. Im Gegensatz dazu zeigten die entsprechenden Werte in der Milz einen gesteigerten Ferritingehalt an. Der prozentuale Eisengehalt im Leberferritin betrug 15,6%, im Milzferritin 19,4% und war damit gegenüber der Normalgruppe herabgesetzt.

4. *Exogene Eisenüberladung.* Besondere Bedeutung kommt der Speichereisenfraktion bei jenen Krankheitszuständen zu, welche mit einer Eisenüberladung des Organismus einhergehen. Einer Gruppe von 5 normalen Ratten wurde in einem Zeitraum von 5 Tagen 100 mg Eisen als Ferrisaccharat (Ferrum Vitis) subcutan appliziert. 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Die Organgewichte von Leber und Milz zeigten keine Veränderung gegenüber der Norm. Die Turnbullreaktion ergab eine massive Eisenablagerung in Leber und Milz.

Überraschend war das Untersuchungsergebnis im Ferritingehalt, welcher in beiden Organen nicht gesteigert, sondern vielmehr herabgesetzt war. Die Mittelwerte lagen bei der Leber außerhalb des Bereichs der einfachen und bei der Milz sogar der doppelten Standardabweichung. Der prozentuale Eisengehalt wurde im Leber- und Milzferritin mit 22,1 bzw. 24,6% im Bereich der Norm befunden.

Bei weiterer Steigerung der exogenen Eisenzufuhr auf 200 mg Eisen, welches einer 2. Versuchsgruppe über 18 Tage subcutan appliziert wurde, lagen die Ferritinwerte in Leber und Milz im Normbereich, während die Turnbullblaureaktion wie in der vorhergehenden Gruppe eine massive Eisenablagerung anzeigte. Abweichungen im prozentualen Eisengehalt wurden im Leber- und Milzferritin nicht gefunden.

5. *Aktivierung des Abwehrzellsystems.* Eine besondere Form der Eisenstoffwechselstörung findet sich beim Infekt und bei verwandten Krankheitszuständen, welche mit einer Aktivierung des Abwehrzellsystems einhergehen. Bekanntlich kommt es hierbei zu einer raschen Abwanderung des zirkulierenden Plasmaeisens, welches in den aktivierten Reticulumzellen gespeichert wird und histochemisch mit der Turnbullblaureaktion nachweisbar ist (L. HEILMEYER u. Mitarb.). Die Abwanderung aus dem Plasma ist so stark, daß für die Blutbildung nicht mehr genügend Eisen zur Verfügung steht und sich mit längerer Dauer des Infekts eine hypochrome Infektanämie entwickelt. Selbst durch Verabreichung hoher i.v. Eisengaben gelingt es nicht, den erniedrigten Serum-Eisenspiegel auf die Dauer zu heben und die Anämie entscheidend zu beeinflussen. Im Zusammenhang mit diesen Vorgängen erhob sich die Frage, inwieweit sich auch Veränderungen im Ferritinhaushalt des Organismus nachweisen lassen.

Bei einer Fünfergruppe von Albinoratten wurden durch subcutane Injektion von 0,5 cm³ 40%igen Olobintins sterile Entzündungen hervorgerufen, welche eine starke Aktivierung des Abwehrzellsystems bewirkten. 5 Tage nach der Injektion wurden die Tiere getötet. Die Leber- und Milzgewichte dieser Tiergruppe lagen im Vergleich zum Körpergewicht relativ hoch.

Histochemisch war in der Leber eine geringe und in der Milz eine starke Hämosiderinablagerung nachweisbar. Der absolute Ferritingehalt wie auch die Ferritinkonzentration war in Leber und Milz herabgesetzt. Besonders hochgradig war die Verminderung des Ferritingehaltes in der Milz, wo der Mittelwert an der unteren Grenze der doppelten Standardabweichung der Normalgruppe lag. Der prozentuale Eisengehalt des Leber- und Milzferritins war hingegen mit 19 bzw. 21,2% nur geringfügig verändert.

In einer weiteren Versuchsgruppe wurden die durch eine sterile Entzündung ausgelösten Verschiebungen im Speichereisen nach vorausgegangener Eisenüberladung des Organismus untersucht. In einer Vorbehandlungsperiode von 14 Tagen wurden einer Gruppe von 5 Albinoratten je 100 mg Eisen subcutan appliziert. 12 Tage nach Beendigung der Eisenbehandlung wurden durch Injektion von 0,5 cm³ 40%igen Olobintins sterile Entzündungen hervorgerufen. 5 Tage nach Auslösung des Terpentinsabscesses wurden die Tiere getötet. Die Leber- und Milzgewichte waren auch in dieser Versuchsgruppe deutlich erhöht. In beiden Speicherorganen wurden histochemisch massive Eisenablagerungen gefunden. Der absolute Ferritingehalt wie auch die Ferritinkonzentration war gegenüber der Norm herabgesetzt, jedoch erwies sich die

Verminderung des Ferritins nicht so hochgradig wie in der Versuchsgruppe mit Terpentinsabszess allein.

Auffällig waren die Unterschiede im prozentualen Eisengehalt, wo das Leberferritin mit 27,3% einen relativ hohen, das Milzferritin mit 13,4% hingegen einen herabgesetzten Eisengehalt aufwies.

6. *Akute Leberparenchymschädigung.* Da die Leber ein Hauptdepotorgan für die leicht verfügbare Speichereisenverbindung darstellt, war es von Interesse, inwieweit durch eine akute Parenchymschädigung Veränderungen im Speichereisen eintreten. Bei einer Fünfergruppe von Ratten wurde durch subcutane Verabreichung von 0,6 cm³ Tetrachlorkohlenstoff innerhalb von 5 Tagen eine schwere Leberschädigung hervorgerufen. 3 Tage nach Beendigung der Injektion wurden die Tiere getötet. Das Lebergewicht wies einen erhöhten Wert auf, während das Milzgewicht wenig verändert war. Histologisch war eine maximale Verfettung der zentralen Anteile der Leberläppchen eingetreten. Außerdem war Eisen in Leber und Milz histochemisch vermehrt nachweisbar.

Im Ferritingehalt von Leber und Milz zeigte sich eine extreme Verminderung. Die absoluten Ferritinwerte lagen in beiden Organen außerhalb des Streubereichs der doppelten Standardabweichung der Normalgruppe mit Ausnahme eines Einzelwertes in der Milz. Die bevorzugte Schädigung der Leber dokumentiert sich in der hochgradigen Herabsetzung der Ferritinkonzentration, während das Milzferritin weniger stark in Mitleidenschaft gezogen ist. Auch im prozentualen Eisengehalt von Leber- und Milzferritin wurden mit Mittelwerten von 16,8 bzw. 17,4% herabgesetzte Werte gefunden.

Diskussion.

Das Ferritin ist in Leber und Milz der Albinoratte in einer bestimmten Konzentration vorhanden, welche für Leberferritin im Mittel 23,8 mg%, für Milzferritin 64,0 mg% beträgt. Die individuellen Schwankungen im Ferritingehalt der beiden Organe sind beim Normaltier relativ gering. Leber- und Milzferritin weisen einen bestimmten Eisengehalt auf, welcher rund 25% beträgt. Hämosiderin ist unter physiologischen Bedingungen nur in der Milz in geringer Menge vorhanden. Unter Einwirkung wiederholter Äthernarkose waren die Veränderungen im Ferritingehalt nicht uniform. Auch im Eisengehalt des Leber- und Milzferritins wurden signifikante Veränderungen nicht gefunden, während eine gegenüber der Norm gesteigerte Hämosiderinablagerung in der Milz hervortrat. Inwieweit diese vermehrte Ablagerung des histochemisch sichtbaren Eisens in der Milz auf gesteigerten Blutzerfallsvorgängen oder auf „Stress“-Wirkung und Aktivierung des Abwehrzellsystems durch die in kurzfristigen Zeitabständen wiederholte Äthernarkose beruht, kann noch nicht entschieden werden.

Im Zusammenhang damit sei aber erwähnt, daß von H. MESSERLI bei der Ratte nach Äthernarkose eine gesteigerte Hämolyse beobachtet wurde. Andererseits ist durch tiereperimentelle Untersuchungen amerikanischer Autoren bekannt, daß nach ACTH- bzw. Cortisonapplikation eine Verminderung in der Serum-Eisen-Konzentration eintritt, welche nach Blockierung des Reticuloendothels vermindert in Erscheinung tritt (G. CARTWRIGHT u. a.).

Bei akutem Entzug einer größeren Blutmenge greift der Organismus auf seine Eisenreserven zurück, was sich in einer starken Verminderung des prozentualen Eisengehaltes im Leber- und Milzferritin dokumentiert. Durch den Aderlaß wurde aber nicht nur der Eisengehalt, sondern in gleicher Weise auch der Eiweißanteil in Mitleidenschaft gezogen, was besonders in der Verminderung des Leberferritins zum Ausdruck kommt.

Ein völliges Verschwinden des Ferritins aus Leber und Milz, wie es von H. BRAUNSTEINER, E. GISINGER u. F. PAKESCH nach ausgiebiger Blutung auf Grund semiquantitativer Untersuchungsbefunde beschrieben wurde, konnten wir in unseren Versuchen nicht feststellen.

Auch bei gesteigertem Blutabbau durch Vergiftung mit Phenylhydrazin treten erhebliche Veränderungen im Speichereisengehalt hervor. Das in unserer Versuchsanordnung durch den massiven Blutzerfall freiwerdende Eisen wurde dabei vorwiegend in histochemisch sichtbarer Form in den Speicherorganen abgelagert. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer signifikanten Zunahme des Ferritins in der Milz, welche wahrscheinlich auf den vermehrten Anfall von Eisen und Eiweißbausteinen aus dem Hämoglobinabbau beruht. Andererseits wird durch die gesteigerte Blutneubildung, welche schon in den ersten Tagen nach der Hämolyse einsetzt, ein vermehrter Eisen- und Eiweißverbrauch bedingt, welcher sich in den herabgesetzten Eisenwerten des Leber- und Milzferritins wie auch in der Verminderung des Leberferritins dokumentiert.

Von besonderer Bedeutung ist in der menschlichen Pathologie die Speichereisenfraktion bei jenen Zuständen, bei denen der Körpereisengehalt infolge gesteigerter Eisenresorption oder infolge parenteraler Applikation großer Eisenmengen auf ein Vielfaches der Norm ansteigt. Bei experimenteller Eisenüberschwemmung des tierischen Organismus wurde das subcutan zugeführte Eisen vorwiegend in Form des Hämosiderins in Leber und Milz abgelagert, während im Ferritingehalt wahrscheinlich infolge akuten Mangels an Eiweißbausteinen zunächst eine Verminderung eintrat. Ins Gewicht fallende Veränderungen des Eisengehaltes im Ferritinmolekül traten in Leber und Milz nicht ein. Offenbar werden bei akuter Eisenüberschwemmung alle verfügbaren Eiweißbausteine vom Organismus zunächst zur Ablagerung des zugeführten Eisens in Form von Hämosiderin verwandt, während sie nach eingetretener Adaption selbst bei weiterer Fortdauer der Eisenzufuhr auch für die Ferritinbildung wieder verfügbar sind. In der Tat konnten im langfristigen Versuch trotz gesteigerter Eisenzufuhr normale Ferritinwerte in Leber und Milz gefunden werden.

Auch durch Aktivierung des Abwehrzellsystems nach subcutaner Terpentininjektion werden charakteristische Veränderungen im Speichereisen bewirkt. Diese bleiben nicht allein auf eine Eisenverarmung des Ferritins beschränkt. Auch Leber- und Milzferritin sinken auf erniedrigte Werte ab, während das freigesetzte Ferritineisen in histochemisch sichtbarer Form in die Reticulumzellen eingelagert wird. Es treten demnach beim Speichereisen gleichartige ferrokinetische Verschiebungen hervor, wie sie von L. HEILMEYER und Mitarbeitern für das zirkulierende Plasmaeisen beschrieben worden sind, welches beim Infekt ebenfalls ins aktivierte reticuloendotheliale System abwandert und histochemisch eine positive Eisenreaktion zeigt. Im hämosiderotischen Organismus treten die durch Aktivierung des RES induzierten Eisenverschiebungen zugunsten des Hämosiderins in verstärktem Ausmaß hervor. Auch bleibt die Ablagerung des histochemisch nachweisbaren Eisens nicht auf Leber und Milz beschränkt, sondern ist in gleicher Weise auch in den aktivierten Reticulumzellen im Bereich des Entzündungsherdes nachweisbar.

Die Leber nimmt bekanntlich eine zentrale Stellung im Eisenstoffwechsel ein. Erkrankungen des Leberparenchyms gehen stets mit Störungen im Eisenstoffwechsel einher. Nach subakuter Vergiftung der Versuchstiere mit Tetrachlorkohlenstoff waren deshalb von vornherein schwerste Veränderungen im Speichereisen von Leber und Milz zu erwarten. Sie sind durch hochgradigen Schwund des Ferritins in Leber und Milz und durch gleichzeitige Eisenverarmung des Ferritinmoleküls gekennzeichnet. Das anfallende Ferritineisen wird zum Teil in histochemisch sichtbarer Form in Leber und Milz abgelagert.

Andererseits hat die Erfahrung am Krankenbett gezeigt, daß auch das zirkulierende Plasmaeisen bei Parenchymschädigung der Leber auf erhöhte Werte ansteigt. Es ist anzunehmen, daß das freigesetzte Ferritineisen die Vermehrung der Plasmaeisenkonzentration bewirkt.

Zusammenfassung.

Die Gesamtbetrachtung der von uns an Ratten durchgeführten Studien läßt erkennen, daß durch eine detaillierte Analyse der Eisenereserve des Organismus, wie sie durch die Methodik der quantitativen Ferritin- und semiquantitativen Hämosiderinbestimmung ermöglicht worden ist, tiefere Einblicke in die intermediären Vorgänge des Eisenstoffwechsels erlangt werden können.

Ferritin ist normalerweise in Leber und Milz in bestimmten Konzentrationen vorhanden und weist — seiner Depotfunktion entsprechend — einen konstanten Eisengehalt auf. Die individuellen Schwankungen sind von Versuchstier zu Versuchstier relativ gering. Hämosiderin ist unter physiologischen Bedingungen hingegen nur in der Milzpulpa in geringer Menge nachweisbar.

Bei gesteigertem Eisenverbrauch gibt das Ferritin sein Eisen frei, gleichzeitig tritt eine Verminderung in der Ferritinkonzentration beider Speicherorgane ein. Vermehrtes Angebot von Eisen- und Eiweißbausteinen bei experimentell hervorgerufenem Blutzerfall kann eine vermehrte Ferritinbildung in der Milz auslösen. Hingegen wird exogen zugeführtes Ferrieisen in massiven Dosen vornehmlich in histochemisch sichtbarer Form in beide Speicherorgane eingelagert, während Ferritin- und Ferritineisengehalt relativ wenig verändert wird. Eine vermehrte Eisenfixierung in histochemisch sichtbarer Form findet aber auch bei Aktivierung des Abwehrzellsystems statt, wobei gleichzeitig eine Verminderung im Ferritin- und Ferritineisengehalt eintritt. Schwere Leberparenchymschädigungen gehen mit extremem Schwund besonders des Leberferritins wie auch Eisenverarmung des Ferritinmoleküls einher. Das freigesetzte Eisen führt einerseits eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Blutplasma herbei, andererseits wird es in histochemisch nachweisbarer Form in Leber und Milz vermehrt sichtbar.

Literatur.

AUSTONI, M. E., A. RABINOWITCH and D. M. GREENBERG: The iron content of the tissues of normal, anemic and iron-enriched rats freed from blood by viviperfusion. *J. of Biol. Chem.* **134**, 17 (1940). — BRAUNSTEINER, H., E. GISINGER u. F. PAKESCH: Ferritin, Transferrin und Serumeisen. *Klin. Wschr.* **1952**, 394. — CARTWRIGHT, G., L. HAMILTON, C. GUBLER, N. FELLOWS, H. ASHENBRUCKER and M. WINTROBE: The anemia of infection. XIII Studies on experimentally produced acute hypoferrremia in dogs and the relationship of the adrenal cortex to hypoferrremia. *J. Clin. Invest.* **30**, 161—173 (1951). — HEILMEYER, L., u. K. PLÖTNER: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: G. Fischer 1937. — HEILMEYER, L., W. KEIDERLING u. G. STÜWE: Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen. Jena: G. Fischer 1941. — HEILMEYER, L., F. WÖHLER u. W. KEIDERLING: Eine neue quantitative Methode zur Bestimmung des Ferritins in den Organen und ihre vorläufigen Ergebnisse. *Acta haemat.* **12**, 154 (1954). — HUECK, W.: Pigmentstudien. *Beitr. path. Anat.* **54**, 68 (1912). — KEIDERLING, W., u. F. WÖHLER: Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens. I. Mitteilung: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ferritins. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 418 (1954). — MESSERLI, H.: Untersuchungen über Eiweißmangel als Ursache der Hämochromatose. *Internat. Z. Vitaminforsch.* **225**, 35 (1954). — SCHÄFER, K. H.: Bestimmung des Eisens im biologischen Material, insbesondere des Nischthämoglobineisens in geringen Organmengen durch Phenanthrolin als Indikator. *Biochem. Z.* **304**, 417 (1940). — SCHMELTZER, W.: Der mikrochemische Nachweis von Eisen in Gewebeelementen mittels Rhodanwasserstoffsäure und die Konservierung der Reaktion in Paraffinöl. *Z. Mikrosk.* **50**, 99 (1933). — TIRMANN, J.: Einiges zur Frage der Hämolyse und Genese der Gallenfarbstoffbildung bei Vergiftungen. *Görrbersdorfer Veröffentlichungen* **2**, 111 (1898).

Dozent Dr. W. KEIDERLING, Freiburg/Brsg., Med.-Univ.-Klinik, Hugstetterstr. 55.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN).

Beiträge zur Charakterisierung der wirksamen Komponenten von Schlangengiften.

Von

ERNST HABERMANN und WILHELM NEUMANN.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. April 1954.)

Wie bei Bienengift haben wir auch bei Schlangengiften seit einigen Jahren eine papierelektrophoretische Abtrennung einzelner Fraktionen mit einem Vergleich ihrer Wirkungen kombiniert und schon einige Ergebnisse mitgeteilt [NEUMANN, HABERMANN u. AMEND (dort ältere Lit.), NEUMANN (1, 2), HABERMANN (1, 2); NEUMANN u. HABERMANN (1)]. Über direkt-hämolytische und biochemische Wirkungen papierelektrophoretischer Fraktionen verschiedener Schlangengifte haben auch GRASSMANN u. HANNIG (1954) berichtet.

Der Unterschied zwischen Colubriden und Viperiden macht sich auch im pharmakologischen und biochemischen Wirkungsspektrum der Gifte geltend. Cholinesterase findet sich nur bei den Colubriden, proteolytische Aktivität im wesentlichen bei den Viperiden (vgl. ZELLER). Die direkte Hämolyse und die Erregung und Lähmung isolierter Organe erfolgt durch Colubridengifte leichter als durch Viperidengifte, welche aber in der Regel den Blutdruck stärker senken (vgl. GESSNER). Näheres über pharmakologische Unterschiede der Schlangengifte wird eine spätere Mitteilung bringen.

1. *Papierelektrophoretisches Bild verschiedener Schlangengifte.*

Ein Unterschied zwischen Colubriden und Viperiden besteht in großen Zügen auch bei der Papierelektrophorese [HABERMANN (2), GRASSMANN u. HANNIG (1954)].

Methodisches. Wir arbeiteten im wesentlichen nach dem von GRASSMANN u. HANNIG (1952) angegebenen „analytischen“ Verfahren; einige Einzelheiten wurden modifiziert, vor allem um unerwünschte Pufferströmungen nach Möglichkeit auszuschalten: die Deckel der Elektrodengefäße wurden innen mit stark angefeuchtetem Papier beklebt, um schnell eine gleichmäßige Feuchtigkeitssättigung der Luft zu erreichen. Auf Vermeidung von Heberwirkungen wurde besonders geachtet. Die Startlinie befand sich in der Streifenmitte; verlegt man sie anoden- oder kathodenwärts, so versetzt der Einstrom der Flüssigkeit das aufgetragene Material gegen die Mitte des Streifens, auch wenn man den Strom nicht einschaltet. Trocknet der Streifen nach Beendigung der Elektrophorese auf dem Träger, so kann eine Konvektion der Eiweißsubstanz zur Mitte des Streifens hin eintreten, da der freigespannte Teil des Streifens nach beiden Seiten Feuchtigkeit abgibt, der aufliegende Teil nur nach einer; am besten trocknet man auf einem Drahtrahmen.

Bei den bisher von uns untersuchten Colubriden wandert die ganz überwiegende Menge des Giftes bei p_H 7,0 kathodisch, ist also basischer Natur, bei den Viperiden dagegen wandert in der Regel der größere Teil anodisch; das Gift der *Vipera russelli* läuft aber ebenfalls überwiegend kathodisch.

Die prozentuale Zusammensetzung schwankt manchmal auch beim Gift der gleichen Schlangenart von Charge zu Charge stark. Besonders deutlich sahen wir dies bei Naja-Giften. Ein von der Firma Basilisk (Basel) geliefertes *Nigricollis*-Gift zeigte 3 relativ schnell und 2 langsamer kathodisch wandernde Fraktionen. Eine andere Probe dagegen ergab 3 starke Fraktionen, von denen nur 2 kathodisch wanderten und die dritte langsam anodisch lief; dazwischen lagen 2 weitere schwache Komponenten. Auch 2 Giftproben von *Naja haje* unterschieden sich in Zahl, Wanderungsgeschwindigkeit und Stärke der Fraktionen (Abb. 1). Erhebliche Schwankungen in der Zusammensetzung der Giftchargen sind übrigens schon von südamerikanischen Autoren (GONCALVES u. VIEIRA) mit dem TISELIUS-Verfahren festgestellt worden und drücken sich auch in Toxizitätsunterschieden aus. Wir verzichten daher auf eine Wiedergabe der photometrisch-planimetrischen Auswertungen, zumal kein Umrechnungsfaktor [GRASSMANN u. HANNIG (1952)] von Extinktion auf Konzentration bekannt ist und F. G. FISCHER und W. P. NEUMANN inzwischen über die TISELIUS-Analyse einiger von uns [HABERMANN (4)] untersuchter Schlangengifte berichtet haben.

Die Papierelektrophorese läßt einige bisher anscheinend nicht bekannte biochemische Besonderheiten der Gifte erfassen. So beobachteten wir in den Giften von *Vipera ammodytes*, *Vipera berus*, *Agkistrodon piscivorus*, *Agkistrodon contortrix* und *Vipera russelli* eine schnell kathodenwärts laufende „Rotfraktion“, die sich mit Amidoschwarz 10b nicht wie üblich blau, sondern weinrot färbt. Die „Rotfraktionen“ von *Vipera ammodytes*, *Vipera berus* und *Angkistrodon piscivorus* wandern gleich schnell. Wir fanden eine derartige Komponente nicht in den Giften von *Bitis arietans* (hier wandert eine ninhydrinpositive Fraktion schnell kathodisch), *Bothrops jararaca*, *Crotalus terrificus*, *Naja naja*, *Naja nigricollis* und *Naja haje*, desgleichen nicht im Bienengift. Es handelt sich nicht um Cytochrom C oder Adenosin, wie Vergleichsversuche zeigten; die Fraktion fluoresciert auf dem getrockneten Papier im ultravioletten Licht nicht, ein typisches UV-Spektrum konnte bisher nicht erhalten, ebenso kein Zusammenhang zwischen „Rotfraktion“ und

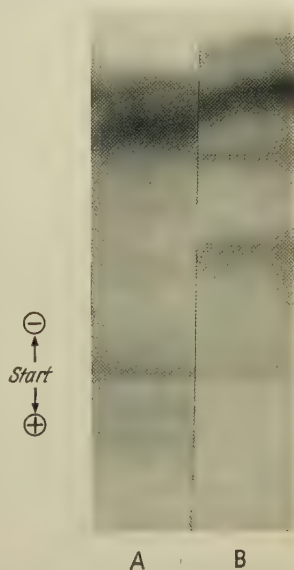


Abb. 1. Elektropherogramm zweier Proben von *Naja haje*-Gift. Je 1 mg Gift A bzw. B auf dem gleichen Streifen WHATMAN I-Papier; 4 V/cm, 14 Std bei 18°, Phosphatpuffer p_H 7,0, Ionenstärke 0,15. Amidoschwarzfärbung. Zur Reproduktion aus jedem „Giftband“ ein Längsstreifen herausgeschnitten.

Toxicität, Blutdrucksenkung, Protease- oder Phospholipaseaktivität der Gifte gefunden werden.

Auf Pherogrammen von Schlangengiften beobachtet man im UV-Licht Streifen von blauer oder gelber Fluoreszenz, worauf wir bereits früher hingewiesen haben (NEUMANN, HABERMANN u. AMEND). Zum Teil scheinen besonders die blau fluoreszierenden Streifen bestimmten Eiweißfraktionen zu entsprechen, zum Teil beobachtet man sie aber auch anodenwärts von den mit Amidoschwarz färbbaren Zonen. Dabei ist unter anderem daran zu denken, daß Schlangengifte Flavine enthalten (BROOKS).

Die am schnellsten kathodisch wandernde Fraktion von Kobragift (*Naja naja*) besitzt annähernd die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die Fraktion I des Bienengiftes, die sich jedoch von ihr durch ihre stärkere Neigung zur Schwanzbildung unterscheidet. Protaminsulfat läuft etwa 25% schneller als die beiden eben genannten Fraktionen von *Naja*- bzw. Bienengift.

2. Verteilung einiger Schlangengiftwirkungen auf die papierelektrophoretischen Komponenten.

Wir prüften die Fraktionen auf Wirkungen, die durch Phospholipase A herbeigeführt werden, ferner auf direkte Hämolyse, Proteolyse und Blutdrucksenkung.

Methodik. Die Gewinnung der Fraktionen erfolgte ähnlich wie bei Bienengift [NEUMANN u. HABERMANN (1)]. 9 cm breite Streifen von Whatman I-Papier wurden mit Phosphatpuffer (pH 7,0) getränkt, mit je 2 mg Gift (10%ig in 0,85% iger Kochsalzlösung) beschickt und 12–14 Std der Elektrophorese bei 18° und etwa 4 Volt/cm unterworfen. Bei Vorversuchen hatten Auftrennungen bei anderen pH-Werten keinen wesentlichen Vorteil gebracht. Von den bei Zimmertemperatur getrockneten Streifen wurden etwa 1 cm breite Bahnen von den Längsseiten abgeschnitten und mit Amidoschwarz 10b gefärbt. Die so lokalisierten Fraktionen wurden aus dem ungefärbten Rest des Streifens ausgeschnitten und mit jeweils gleichen Mengen physiol. Kochsalzlösung eluiert. Die „leeren“ Flächen zwischen den Fraktionen wurden miteluiert, um auch ungefärbte Bestandteile zu erhalten. Obwohl sich die tatsächliche Konzentration so nicht erfassen läßt, sind doch die Relativwerte der einzelnen Fraktionen, wie wiederholte Versuche zeigten, gut vergleichbar.

Die Phospholipase-Aktivität wurde mit der Dotterkoagulationsmethode (FLECKENSTEIN u. FETTIG) nach HABERMANN und NEUMANN bestimmt (0,5 cm³ Eluat + 4,5 cm³ Eigelbverdünnung 4:5 mit physiol. Kochsalzlösung 2 Std bei 37°; Koagulation bei 98° in 16 mm weiten Reagensgläsern), in einigen Fällen zusätzlich nach NEUMANN und HABERMANN (2) durch die hämolytische Wirkung des aus Lecithin gebildeten Lysocithins oder nach HABERMANN (3) durch Thromboplastin-Inaktivierung.

Die direkt hämolytische-Wirkung prüften wir an einer 0,6% igen, 3 mal gewaschenen Suspension menschlicher Blutkörperchen in Phosphatpuffer von pH 7,0 (vgl. NEUMANN, HABERMANN u. HANSEN).

Die Proteolyse wurde nach PANTLITSCHKO, KAISER u. ANDRES ermittelt (1 cm³ Giftlösung in physiol. Kochsalzlösung, 1 cm³ Phosphatpuffer [pH 7,6] und 1 cm³ 2,5% iges Casein in Aqua dest. 5 Std bei 37°; anschließend Zusatz von 3 cm³ 16% iger Trichloressigsäure, nach 30 min filtrieren. Zu 3 cm³ des Filtrates 3 cm³ 10% iger Natronlauge, Extinktion bei 285 m μ im BECKMAN-Photometer bestimmt).

Die *Blutdrucksenkung* durch Viperidengifte wurde bei Katzen (Narkose: Pernocton bzw. Chloralose-Urethan [1,0 bzw. 10,0, Aqua dest. ad 50,0]) mit einem Quecksilbermanometer aus der Carotis communis auf einem Rußkymographion aufgezeichnet unter Gegenstrominfusion nach TRENDLENBURG; gerinnungshemmende Mittel wurden nicht verwendet, weil nach Erfahrungen mit Bienengift [HABERMANN (1)] ein Antagonismus gegenüber bestimmten Schlangengiftkomponenten möglich erscheint. Die Präparate wurden in physiol. Kochsalzlösung in die Vena femoralis injiziert. Um die bekannte starke Tachyphylaxie der Viperidengifte zu vermeiden, wurden die Fraktionen, welche nach Vorversuchen die Blutdrucksenkung verursachten, stets am Schluß einer Versuchsserie verabreicht.

Tabelle 1. Wirkungen von Kreuzottergift¹.

Gift	Blutdrucksenkung mm Hg	Dotterkoagulationszeit (min)	Proteolyse (E bei 285 m μ)
0,05 mg.	—	180	0,188
0,025 mg.	—	33	—
0,0125 mg.	—	17	—
Fraktion 1.	0	1,5	0,020
„ 2.	0	2,0	0,010
„ 3.	7	7,5	0,025
„ 4.	24	9,5	0,066
„ 5.	0	90	0,096
„ 6.	0	2,5	0,156
„ 7.	0	2,0	0,024

¹ Die Fraktionen wurden mit je 10 cm³ NaCl-Lösung aus 5 Streifen bzw. etwa 6,0 mg Gift eluiert. Die Blutdrucksenkung bezieht sich auf je 0,5 cm³ i. v. bei einer Katze von 2,8 kg (5,6 cm³ Chloralose-Urethan i. m., künstl. Beatmung).

Viperidengifte. Das Gift der Kreuzotter (*Vipera berus*) liefert bei der Papierelektrophoreseneben der „Rotfraktion“ mindestens 7 mit Amidoschwarz färbbare Komponenten, von denen aber bisher nur die von uns als 4, 5 und 6 bezeichneten eine biochemische bzw. pharmakologische Wirkung zeigen (Tab. 1): Blutdrucksenkung vorwiegend in 4, Phospholipase-Aktivität in 5, Proteolyse vorwiegend in 6. Es besteht also kein strenger Zusammenhang

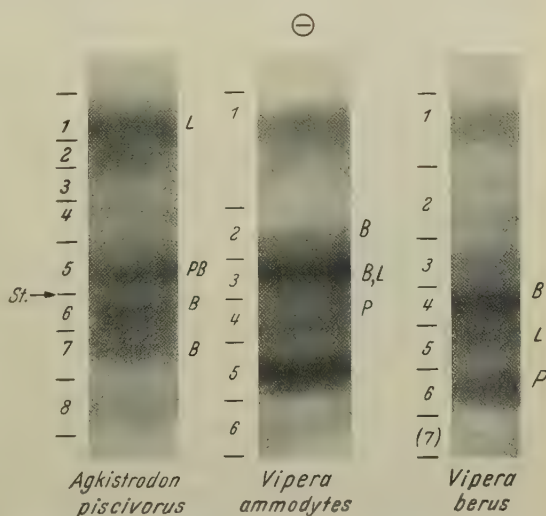


Abb. 2. Elektropherogramm der Gifte von Agkistrodon piscivorus und Vipera ammodytes bzw. berus. Je 1 mg Gift auf dem gleichen Streifen, sonst wie bei Abb. 1. P, L, B Maximum der Protease, Lecithinase (Phospholipase), Blutdrucksenkung.

zwischen Blutdrucksenkung einerseits und Phospholipase- oder Protease-Aktivität andererseits.

Das Gift der *Vipera ammodytes* steht dem der Kreuzotter nahe, unterscheidet sich von ihm aber wesentlich im elektrophoretischen Bild (vgl. Abb. 2). Es liefert neben der schneller laufenden „Rotfraktion“ mindestens 6 mit Amidoschwarz deutlich abgrenzbare Streifen, von denen aber nur die Fraktionen 2—5 für die von uns untersuchten Wirkungsqualitäten von Bedeutung sind: Blutdrucksenkung wird durch Fraktion 2 und 3 hervorgerufen, Phospholipase A findet sich in 3, Protease im wesentlichen in 4, zum Teil aber noch im vorderen Teil von 5 (Tab. 2).

Tabelle 2. Wirkungen von *Vipera ammodytes*-Gift.

Gift	Blutdruck- senkung ¹ mm Hg	Dotter- koagulation Zeit (min)	Proteolyse (E bei 285 m μ)
0,125 mg.	—	—	0,391
0,05 mg.	—	120	—
0,025 mg.	—	63	—
0,0125 mg.	—	19	—
0,0062 mg.	—	5	—
Fraktion 1.	0	2,3	0,000
„ 2.	42	2,5	0,000
„ 3.	42	120	0,006
„ 4.	0	6	0,121
„ 5a	0	6,5	0,047
„ 5b	0	7,8	0,005
„ 6.	0	2,0	0,000

¹ Katze 1,5 kg (0,11 g Pernocton i. m., Spontanatmung); vgl. im übrigen Fußnote zu Tab. 1.

Das Gift von *Agkistrodon piscivorus* unterscheidet sich wesentlich von dem der anderen beiden Vipern (vgl. Abb. 2). Die Fraktionen 1 und 2 wandern rasch kathodisch, 3 (5—7) bleiben in der Nähe der Startlinie, vor den letztgenannten sind im durchfallenden Licht noch 2 weitere, schwache Streifen zu erkennen. Blutdrucksenkung erhält man bei 5—7 mit dem Maximum in 6. Phospholipase A findet sich in 1, ein Teil dieser Wirkung aber auch in 7, das Maximum der Protease in 5 (Tab. 3).

Bei einer weiteren Versuchsreihe mit Agkistrodongift wurden die Fraktionen in 4 Gruppen (Fraktion 1 und 2; 3 und 4; 5—7; 8) eluiert. Hierbei bestätigte sich, daß die Blutdrucksenkung allein durch die Fraktionen 5—7 hervorgerufen wurde. Die Phospholipase A war bei Prüfung im methanolhaltigen Ansatz nach NEUMANN u. HABERMANN (2) nur in Fraktion 1 und 2 nachweisbar; sie war hier mindestens 10mal aktiver als in den übrigen Gruppen. Auch Thromboplastin-Inaktivierung wurde durch diese Gruppe ausgelöst.

Tabelle 3. Wirkungen von *Agkistrodon piscivorus*-Gift.
(8,0 mg Gift; jede Fraktion mit 6,0 cm³ eluiert.)

Gift	Blutdruck- senkung mm Hg ¹	Dotter- koagulation Zeit (min)	Proteolyse (E bei 285 mμ)
0,05 mg.	13	—	0,383
0,025 mg.	—	110	—
0,0125 mg.	—	8	—
Fraktion 1.	0	ca. 120	0,000
„ 2.	0	2,5	0,010
„ 3 + 4.	0	2,0	0,080
„ 5.	7 6 ²	2,0	0,326
„ 6.	7 13 ²	2,3	0,180
„ 7.	6 4 ²	7 (!)	0,061
„ 8.	0	2,5	0,006

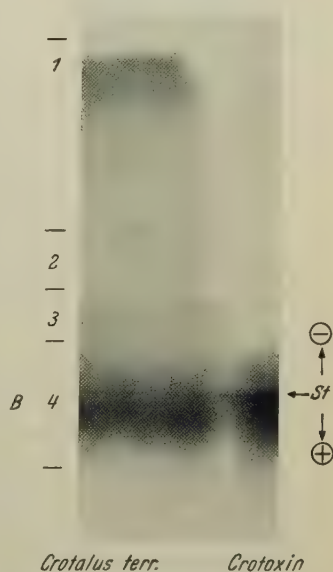
¹ Katze 1,8 kg (Pernocton 0,11 g i. m., 0,036 i. v.; Spontanatmung).² Werte eines anderen Versuches.

Crotalus terrificus-Gift liefert mindestens 4 Fraktionen, von denen eine schnell zur Kathode]laufende mit Crotamin (GONCALVES u. G. VIEIRA) identisch sein dürfte, während die langsam anodisch wandernde Fraktion 4 dem Crotoxin (SLOTTA) entspricht, wie Vergleichsversuche zeigten. Zwischen diesen beiden großen Fraktionen finden sich noch 2 schwache, ganz langsam kathodisch wandernde (Abb. 3).

Zur Prüfung der blutdrucksenkenden und atemlähmenden Wirkung wurden 5 Streifen mit je 1,2 mg Gift mit insgesamt 10 cm³ physiol. Kochsalzlösung pro Fraktion eluiert. 0,5 cm³ vom Eluat der Fraktion 4 senkten den Blutdruck einer mit Pernocton narkotisierten Katze um 97 mm Hg und lähmten gleichzeitig die Spontanatmung. Anschließend waren gleiche Mengen von Fraktion 1, 2 und 3 gänzlich unwirksam, während Fraktion 4 bei einer 2. Injektion nochmals den Druck um 73 mm senkte.

Die blutdrucksenkende und wohl auch die atemlähmende Wirkung von *Crotalus terrificus*-Gift findet sich somit in Fraktion 4. Da diese das Crotoxin enthält, dürfte ihr im wesentlichen auch die Phospholipase-Aktivität und die Allgemeintoxizität zuzuschreiben sein.

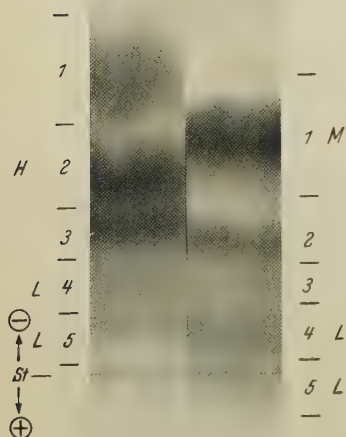
Colubridengifte. Auf die Verschiedenheit der elektrophoretischen Bilder von *Naja nigricollis*-Gift verschiedener Herkunft haben wir bereits hingewiesen. Wir benutzten ein von der Firma Basilisk (Basel) bezogenes Präparat sowie ein von F. G. FISCHER u. W. P. NEUMANN untersuchtes, aus *Erythräa* stammendes Gift. Beide

Abb. 3. *Crotalus-terrificus*-Gift und Crotoxin. Laufzeit 16 Std, sonst wie bei Abb. 1. B blutdrucksenkende und atemlähmende Komponente.

besaßen direkt-hämolytische Wirkung. Es interessierte uns daher vor allem die Verteilung der Phospholipase-Aktivität und ihre Beziehung zur direkten Hämolyse.

6 Streifen mit je 1,2 mg des aus Basel bezogenen Giftes wurden in 5 Fraktionen (vgl. Abb. 4) zerschnitten und mit insgesamt 9 cm³ 0,85%iger Kochsalzlösung pro Fraktion eluiert.

Die direkt-hämolytische Wirkung fand sich im wesentlichen in Fraktion 2 und 3. Fraktion 2 läßt sich durch länger dauernde Elektrophorese nochmals in 2 annähernd gleich stark färbare Teile trennen; das Maximum der direkt hämolytischen Aktivität findet sich im langsamer kathodisch wandernden.



N. nigricollis *N. naja*

Abb. 4. *Naja naja*- und *Naja nigricollis*-Gift. Bedingungen wie bei Abb. 1. *H*, *M*, *L* Maximum der direkten Hämolyse, Muskelelektrophorese (Froschsartorius), Lecithinase (Phospholipase).

Die Bestimmung der Phospholipase-Aktivität stieß auf erhebliche Schwierigkeiten; die verschiedenen Tests auf Phospholipase A ergaben für die einzelnen Fraktionen unterschiedliche Werte. Das Maximum der Dotterkoagulationshemmung fand sich in den Fraktionen 4 und 5, das der Lysocithinbildung in einer methanolhaltigen Lecithinemulsion nach NEUMANN und HABERMANN (2) in 4; es bestand aber bei diesen Versuchsanordnungen eine verschiedene Relation der Aktivität der einzelnen Fraktionen: während im Dotterkoagulationstest die Aktivität von Fraktion 4 und 5 zu 2 und 3 abfiel, lautete die Reihenfolge im „Lecithasetest“ $4 > 2 > 3 > 5 > 1$. Noch stärker war die Diskrepanz bei der Auswertung des Thromboplastinabbaus, bei dem sich die Reihenfolge $2 > 3 > 4 > 1 > 5$ ergab.

Man könnte nach diesen Befunden vermuten, Lecithinspaltung, Dotterkoagulationshemmung und Thromboplastin-Inaktivierung seien durch verschiedene Prinzipien bedingt, und GRASSMANN u. HANNIG (1954) haben

kürzlich aus ähnlichen Befunden geschlossen, die Hemmung der Hitze-koagulation von Eidotter sei kein Effekt der Lecithinase (Phospholipase) A der Gifte. In Wirklichkeit ist aber die Hemmung der Dotterkoagulation sicher mit dem Lecithinabbau gekoppelt, wie wir an anderer Stelle für die Phospholipase A des Bienengiftes eingehend begründet haben (HABERMANN u. NEUMANN).

Bei unserem aus Basel bezogenen *Nigricollis*-Gift haben wir bei einigen Fraktionierungen die Verzögerung der Hitze-koagulation und das hämolytische, auf Lysocithinbildung beruhende Vermögen des mit den Fraktionen bebrüteten Eigelbs direkt verglichen; stets ergab sich ein eindeutiger Parallelismus zwischen Koagulationshemmung und hämolytischem Vermögen (vgl. Tab. 4).

Die Dotterkoagulationsansätze wurden wie üblich mit geeigneten Verdünnungen der Eluate bebrütet, unmittelbar vor der Koagulation wurde von jedem Ansatz 1 cm³ mit 9 cm³ Puffer verdünnt; hiervon vereinigte man 0,5 cm³ mit 9,5 cm³ 1% iger Erythrocytensuspension. Nach 40 min Inkubation bei 37° wurde zentrifugiert und die Hämoglobinnmenge im Überstehenden mit dem BECKMAN-Photometer in Form der Differenz der Extinktion bei 580 und der Trübung bei 620 m μ bestimmt.

Tabelle 4. Hitze-Koagulationszeit (t_K min) und hämolytische Wirkung von Eigelb nach Einwirkung der Fraktionen von *Nigricollis*-Gift.

Fraktion	1 : 5 verdünnt		1 : 15 verdünnt		1 : 45 verdünnt		1 : 135 verdünnt	
	t_K	Häm.	t_K	Häm.	t_K	Häm.	t_K	Häm.
1	2,0	0	1,8	0	1,8	0	1,8	0
2a	2,8	0	2,5	0	2,5	0	2,0	0
2b	10	3%	2,5	0	2,0	0	2,0	0
3	12	4%	4,5	0	3,0	0	2,0	0
4	> 120	97%	35	24%	6,5	2%	2,5	0
5	> 120	99%	60	66%	8,0	3%	2,8	0
Startstelle	2,5	0	1,8	0	1,5	0	1,5	0
Gesamtgift	1:50000		1:150000		1:450000		1:1350000	
	> 120	100%	> 120	98%	49	47%	9,8	4,5%

GRASSMANN und HANNIG (1954) haben ihre Phospholipase-Auswertungen nach SUMNER und SOMERS vorgenommen. Als wir in einer besonderen Versuchsreihe die Phospholipase in den einzelnen Fraktionen ebenfalls in dieser Weise untersuchten, aber gleichzeitig dieser Anordnung wieder die eben erwähnte Kombination von Dotterkoagulation und Hämolyse gegenüberstellten, bestand bei dieser wieder deutliche Parallelität hinsichtlich der Fermentaktivität der Fraktionen, in dem nach SUMNER und SOMERS verdünnten Eigelb war aber das Hämolysemaximum gegenüber dem Maximum beider Qualitäten des „kombiniert ausgewerteten Versuches“ deutlich kathodenwärts verschoben. Wir kommen hierauf weiter unten zurück.

Das Gift von *Naja naja* (Abb. 4) zeigt das Maximum von Phospholipoidspaltung, Dotterkoagulationshemmung, Dehydrasen-Inaktivierung und Thromboplastinabbau in den Fraktionen 4 und 5. Die ihm eigene Muskelwirksamkeit findet sich dagegen vorwiegend in Fraktion 1 (Froschsartorius, Rattenzwerchfell, durchströmtes Kaninchenohr), worauf wir in einer späteren Mitteilung zurückkommen.

Besprechung der Ergebnisse.

Im Vergleich zu vorgereinigttem Bienengift (Pikratgift), an welchem wir die präparative und analytische Methode der Fraktionierung tierischer Gifte für unsere Zwecke entwickelten, bestehen die Schlangengifte aus wesentlich mehr aktiven Komponenten. Da von Charge zu Charge des gleichen Giftes erhebliche Unterschiede in Wanderungsgeschwindigkeit und Stärke der Fraktionen bestehen können, treffen vielleicht die bisher erhobenen Befunde bis zu einem gewissen Grade nur für bestimmte Muster der Gifte zu.

Andererseits halten wir es für möglich, daß die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeit aktiver Fraktionen weniger durch Abweichungen in der chemischen Zusammensetzung der eigentlichen Wirkstoffe als durch solche von Begleitsubstanzen bedingt sind. Vermutlich sind in den Giftproben von *Naja haje* die beiden schnellsten Fraktionen, welche in beiden Giften annähernd das gleiche Stärkeverhältnis aufweisen, im Grunde identisch, aber durch Unterschiede der Aufarbeitung oder durch Anwesenheit oder Fehlen von Begleitsubstanzen zu der verschieden schnellen Wanderung veranlaßt worden. Ohne derartige Annahmen erscheint es auch schwer verständlich, daß die blutdrucksenkenden, phospholipoidspaltenden und proteolytischen Komponenten der Gifte von *Vipera berus* und *ammodytes* verschieden schnell laufen, während zahlreiche enge immunologische und sonstige Verwandtschaften zwischen diesen beiden Giften bestehen. Es muß bei solchen Überlegungen berücksichtigt werden, daß bei der Elektrophorese Aktivatoren oder Inhibitoren entfernt oder Wirkstoffe möglicherweise mit einer an sich unwirksamen Fraktion verschleppt werden können.

Wir möchten annehmen, daß der oben (S. 394) erwähnten unterschiedlichen Phospholipase-Aktivität der Fraktionen von Nigricollisgift gegenüber der 40%igen Eigelbemulsion des Dotterkoagulationstestes und der 4%igen Eigelbemulsion des Lecithasetestes nach SUMNER und SOMERS derartige Vorgänge zugrunde liegen. In konzentriertem Eigelb scheint die Phospholipase A optimal aktiviert zu sein; die des Bienengiftes ließ sich jedenfalls bisher durch keinen der in verdünnten Ansätzen wirksamen Aktivatoren verstärken (HABERMANN u. NEUMANN). Falls die oben als Fraktion 2 und 3 von Nigricollisgift bezeichneten Komponenten als Aktivatoren fungieren — Bienengift-Phospholipase A wird durch Eiweiß aktiviert [HABERMANN (2)] — so könnte diese Aktivitätsvermehrung nur in der methanolhaltigen Lecithinlösung des Phospholipasetestes nach NEUMANN und HABERMANN bzw. im verdünnten Eigelbansatz zum Vorschein kommen.

Bei Ansätzen nach SUMNER und SOMERS kann an einer scheinbaren Wirkungsverschiebung der Phospholipase A außerdem das direkt-hämolysierende Prinzip des Giftes beteiligt sein; beim Bienengift wird die Aktivität des direkt-hämolysierenden Prinzips durch die Phospholipase der indirekt-hämolysierenden Fraktion II verstärkt (vgl. HABERMANN u. NEUMANN). Überdies hat die Methode nach SUMNER und SOMERS noch den Nachteil, daß die lange (14stündige) Bebrütung das Wachstum eingeschleppter Bakterien stark begünstigt, und die visuelle Schätzung der Hämolyse in dem nicht zentrifugierten Ansatz bedingt noch eine weitere Unsicherheit.

Vergleicht man die Wanderungsgeschwindigkeit der nämlichen aktiven Prinzipien bei den verschiedenen Giften, so kann man — mit den oben erwähnten Vorbehalten — folgende Reihenfolge aufstellen: Die Phospholipase A von *Agkistrodon piscivorus*-Gift läuft am schnellsten kathodisch, dann folgt die von Nigricollis-Gift, annähernd ebenso schnell die von Bienengift, dann die von *Naja naja*-, *Ammodytes*- und *Berus*-Gift. Die proteolytische Wirkung der Gifte wandert bei *Agkistrodon* ebenfalls schneller kathodenwärts als bei *Ammodytes*, die von *Berus*-Gift tendiert anodenwärts.

Bei Schlüssen auf chemische Unterschiede der eigentlichen Wirkstoffe ist, wie schon oben S. 396 ausgeführt, Vorsicht geboten. Dagegen ergeben sich aus unseren Befunden wesentliche Aussagen bezüglich einiger pharmakologischer Wirkungen der Gifte: es besteht — wie beim Bienengift — kein Zusammenhang zwischen Phospholipase-Aktivität und direkter Hämolyse, wie das Beispiel des Nigricollis-Giftes zeigt. Ferner hängt die blutdrucksenkende Wirkung der Viperidengifte weder von deren Protease noch Phospholipase ab.

Zusammenfassung.

6 Schlangengifte wurden zur pharmakologischen und fermentchemischen Untersuchung papierelektrophoretisch aufgetrennt. Die Komponenten der Colubridengifte wandern überwiegend kathodisch, die der Viperidengifte dagegen kathodisch und anodisch. Zahl, Wanderungsgeschwindigkeit und Stärke der einzelnen Fraktionen wechseln nicht nur von Art zu Art, sondern auch von Charge zu Charge des Giftes.

In mehreren, aber nicht in allen Viperidengiften findet sich eine stark basische Fraktion, welche sich mit Amidoschwarz weinrot färbt („Rotfraktion“).

Papierelektrophoretisch lassen sich die proteolytischen, blutdrucksenkenden und phospholipoidspaltenden Komponenten von Viperidengiften (*Vipera ammodytes*, *Vipera berus*, *Agkistrodon piscivorus*), die direkt und indirekt hämolysierenden Anteile des Giftes von *Naja nigricollis* sowie die blutdrucksenkende Komponente von *Crotalus terrificus*-Gift lokalisieren. Die Wanderungsgeschwindigkeit gleicher Prinzipien ist auch bei sonst nahe verwandten Giften verschieden.

Die durch Schlangengifte bewirkte Hemmung der Hitzegerinnung von Eigelb beruht auf der Phospholipase A der Gifte; Befunde, die hierzu scheinbar in Widerspruch stehen, werden diskutiert.

Die Blutdrucksenkung durch die genannten Viperidengifte und deren Fähigkeit zur Phospholipoidspaltung und zur Proteolyse sind voneinander unabhängig.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Sachbeihilfen, Herrn Professor K. SLOTTA (Sao Paulo) für Crotoxin, Herrn Dr. KELLAWAY (London) für Naja-naja-Gift.

Literatur.

- BROOKS, G.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **209**, 248 (1939). — Ann. Inst. Pasteur **64**, 558 (1940). — FISCHER, F. G., u. W. P. NEUMANN: Z. physiol. Chem. **297**, 92, 100 (1954). — FLECKENSTEIN, A., u. B. FETTIG: Z. Naturforsch. **6b**, 213 (1951). — GESSNER, O.: in Heffter-Heubner, Hdb. d. exper. Pharmakologie, Erg. Bd. **6**, S. 1. Berlin 1936. — GONCALVES, J., u. L. G. VIEIRA: An. Acad. Brasil. Ci. **22**, 141 (1950). — GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Z. physiol. Chem. **296**, 30 (1954); **290**, 1 (1952). — HABERMANN, E. (1): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 108 (1953);

222, 173 (1954). — HABERMANN, E. (2): Ber. Physiol. **162**, 366 (1954). — HABERMANN, E. (3): Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **223**, 182 (1954). — HABERMANN, E. (4) Z. physiol. Chem. **297**, 104 (1954). — HABERMANN, E., u. W. NEUMANN: Z. physiol. Chem. **297**, 179 (1954). — NEUMANN, W. (1): Ber. physikal.-med. Ges. Würzburg **66**, 166 (1953). — NEUMANN, W. (2): Naturwissenschaften **41**, 322 (1954). — NEUMANN, W., u. E. HABERMANN (1): Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **222**, 367 (1954). — NEUMANN, W., u. E. HABERMANN (2): Z. physiol. Chem. **296**, 166 (1954). — NEUMANN, W., E. HABERMANN u. G. AMEND: Naturwissenschaften **39**, 286 (1952). — NEUMANN, W., E. HABERMANN u. H. HANSEN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 130 (1953). — PANTLITSCHKO, M., E. KAISER u. H. ANDRES: Biochem. Z. **322**, 526 (1952). — SLOTTA, K., u. H. FRAENKEL-CONRAT: Mem. Inst. Butantan (port.) **12**, 505 (1938). — SUMNER, J., and G. SOMERS: Chemistry and Methods of Enzymes, S. 78. New York 1953. — ZELLER, E. A.: in SUMNER-MYRBÄCK „The Enzymes“, I, 2, S. 986. New York 1951.

Prof. Dr. Dr. W. NEUMANN, Würzburg, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Über die Bedeutung des Histamins für die Phagocytose von Tuschepartikelchen durch Endothelien.

Von

HELMUT KEWITZ und KARIN MORGAN.

Mit 14 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. März 1954.)

M. JANCsó (1947) hat die Ansicht geäußert, daß retikulo-endotheliale Zellen durch Histamin zu gesteigerter Phagocytose angeregt werden, und die Endothelien anderer Capillaren durch Histamin zur Phagocytose befähigt werden können. Damit würde dem Histamin eine wichtige Aufgabe für die Abwehr von Bakterieninvasionen zufallen, die bei der Behandlung von Infektionskrankheiten und Wunden durchaus zu beachten wäre. JANCsó hat zur Begründung seiner Ansicht in der Hauptsache folgende Versuche durchgeführt:

1. Unter der Einwirkung subcutan applizierten Antistins (2-N-phenyl-N-benzylaminomethyl-Imidazol) verschwindet in die Blutbahn injizierte Tusche langsamer als ohne diese Vorbehandlung.

2. Eine mit Histamin behandelte Stelle an der Bauchhaut der Ratte zeigt nach intravenöser Tuscheinjektion eine deutliche Schwärzung, die noch mehrere Stunden nach Verschwinden der Tusche aus dem Blut vorhanden ist. Die nicht behandelte Haut nimmt innerhalb 30 min wieder normale Farbe an. Bei mikroskopischer Betrachtung liegen die Rußpartikelchen in den Capillarendothelien, sind also von diesen phagocytirt. Durch vorhergehende Behandlung der Tiere mit 30 mg Antistin pro Tier läßt sich die Schwärzung der mit Histamin behandelten Hautstelle verhindern. Das heißt die durch Histamin induzierte Phagocytose der sonst nicht phagocytierenden Endothelien wird durch ein Antihistaminicum aufgehoben.

3. Die isoliert durchströmte Rattenleber hält unter der Einwirkung von Histamin aus einer verdünnten Tuschelösung so viele Rußpartikelchen zurück, daß die ausströmende Flüssigkeit klar und durchsichtig erscheint. Der Autor meint, daß es sich hierbei um eine aktivierende Wirkung des Histamins auf die phagocytierenden KUPFFERSchen Sternzellen handle und sieht diese Ansicht bekräftigt, weil der Effekt mit dem Antihistaminicum Antistin aufgehoben werden kann.

Wegen der großen physiologischen Bedeutung der Phagocytose schien es wichtig nachzuprüfen, ob die Antihistaminica in diese Abwehrreaktion des Organismus eingreifen. Wenn JANCsó's Ansicht richtig ist, wäre zu erwarten, daß andere Antihistaminica ähnliche Wirkungen haben wie Antistin. Allerdings ließen die sehr hohen Dosen, die JANCsó verwendet hat, kaum eine spezifische Wirkung vermuten.

Zunächst wurde der oben unter Nr. 2 geschilderte Versuch durchgeführt und dabei festgestellt, daß die Befunde nicht zu reproduzieren

sind, falls die Tiere vorher mit Urethan narkotisiert werden. Die Experimente verliefen aber planmäßig, wenn die Ratten nicht narkotisiert waren. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen außer mit Antihistaminica auch mit narkotisch wirkenden Substanzen durchgeführt.

Methodik.

Die Versuchsanordnung hielt sich eng an die von JANSÓ angegebenen Vorschriften.

1. *Versuche an der Bauchhaut der Ratte.* Eine Stelle von 2,5–3 cm Durchmesser wurde vorsichtig rasiert und 2 min lang mit 1%iger Histaminsalbe eingerieben. Kurz darauf folgte eine Injektion von 2 cm³/100 g Tier einer Tuschelösung folgenden Zusammensetzung:

0,9% NaCl; 0,03% NaHCO₃; 0,024% CaCl₂; 0,042% KCl; 1% Gelatine; 10% Ausziehtusche (Pelikan, Günther Wagner).

Das Ergebnis war positiv zu werten, wenn 2 Std nach der Tuscheinjektion deutliche Schwärzung zu sehen war. Die Tiere wurden dann getötet und die Bauchhaut zur histologischen Untersuchung in Formalin fixiert. Die zu prüfenden Antihistaminica wurden in 5%iger wäßriger Lösung in 2 Einzelportionen 35 und 15 min vor der Histaminapplikation subcutan gespritzt, und zwar je 2 mal: 15 mg Antistin (2-N-phenyl-N-benzyl-aminomethyl-Imidazol) oder 10 mg Neo-Bridal¹ (N-p-Methoxybenzyl-N-(2-pyridyl)N,N-dimethyl-äthylendiamin), oder 15 mg Thephorin¹ (1-Phenyl-4-methyl-3,4,5,6-tetrahydropyridinden) oder 15 mg Dabylen¹ (Benzhydryl-β-dimethylamino-äthyläther) oder 10 mg Pyribenzamin¹ (N-Benzyl-N-(2-pyridyl)N,N-dimethyläthylendiamin) oder 15 mg Avil¹ (3-Phenyl-3(2-pyridyl)dimethylaminopropan) oder 15 mg Phenergan (N-(β-Dimethylaminopropyl)-phenothiazin) pro Tier.

Die Versuche mit den narkotisch wirkenden Mitteln Urethan (1,5 g pro kg i.p.), Evipan (75 mg/kg i.p.), Bromural (600 mg/kg) und Äther begannen, sobald die Tiere narkotisiert waren. Morphin wurde ebenfalls in 2 Einzelgaben subcutan injiziert in Dosen, die deutliche Somnolenz hervorrufen (7,5 mg/100 g).

2. *Verschwinden intravenös injizierter Tusche aus dem Blut der Ratte.* Die verwendete Tuschelösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie oben angeführt und wurde in gleicher Menge gegeben. In Abständen von 5 min nach der Injektion wurden möglichst gleich große Blutropfen aus dem Schwanz der Ratte auf Filtrierpapier aufgefangen, eingetrocknet, der Blutfarbstoff mit Wasser ausgewaschen und die durch zurückgebliebene Tusche hervorgerufene Veränderung der Lichtreflektion mit einer Photozelle gemessen. Als Eichwerte galten 1. das mit reinem Blut behandelte und ausgewaschene Filtrierpapier und 2. 1 Tropfen der reinen Tuschelösung, der der gleichen Behandlung unterworfen war. Dem Tuschefleck wurde der Wert 200 der Galvanometerskala zugeteilt, dem Filtrierpapier der Wert 0. Die untersuchten Pharmaka wurden in gleicher Dosis und Applikationsform angewendet wie im ersten Abschnitt angegeben.

3. *Versuche an der isoliert durchströmten Leber.* Die Leberdurchströmungsversuche wurden mit wenigen Änderungen nach der von W. RIECHERT, W. RAULE u. H. BÜCHNER angegebenen Methodik durchgeführt und dabei der Druck in der Pfortader, die Durchflußmenge und das Lebervolumen registriert. Als Maß für die Tuscheretention in der Leber diente die Bestimmung der in der ausströmenden

¹ Für die überlassenen Versuchsmengen danken wir den Firmen: Bayer, Leverkusen; Hoffman-La Roche, Grenzach/Baden; Schi-Wa, Averbach; Ciba A.-G., Wehr/Baden; Farbwerke Hoechst, Höchst bei Frankfurt/M.

Flüssigkeit verbliebenen Tuschekonzentration. Dazu wurde im Photozellencolorimeter (nach HAVEMANN) die Trübung gemessen. Die Messung wurde bei einer Verdünnung von 1/1000 mit jeder aufgefangenen Tuscheportion vorgenommen. Die zur Leberdurchströmung verwendete Salzlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,9% NaCl; 0,05% NaHCO_3 ; 0,024% CaCl_2 ; 0,042% KCl; 0,05% Glucose; 0,0025% MgCl_2 .

Versuchsergebnisse.

1. Unmittelbar nach intravenöser Injektion von 2 cm³/100 g 10% iger Tuschelösung traten bei weißen Ratten grauschwarze Verfärbungen der sichtbaren Haut und Schleimhäute auf. Die Augen wurden tiefdunkel, schmutzig-rot. Dieser Effekt verschwand nach etwa 20—40 min. Oftmals aber blieben die Nasenspitze, die Volarseiten der Pfoten und verletzte oder von Milben befallene Hautstellen noch 2—4 Std geschwärzt. Ganz analog imponierte eine mit Histaminsalbe behandelte Stelle der Bauchhaut. Meistens war auch die darunterliegende Muskulatur und oft sogar der Darm in dem entsprechenden Segment grauschwarz verfärbt. Bei der histologischen Untersuchung solcher Hautabschnitte zeigten sich Tuscheartikelchen in den Endothelien der Capillärwände, aber auch in extravasculär gelegenen Histiocyten oder extracellulär in der Umgebung der Capillaren¹.

Durch Vorbehandlung der Tiere mit Antistin und im narkotischen und somnolenten Zustand, wie er durch Urethan, Äther, Evipan, Bromural oder hohe Dosen Morphin hervorgerufen werden kann, wurde die Wirkung der Histaminsalbe unterdrückt. Die Antihistaminica Thephorin, Pyribenzamin, Avil, Dabylon, Phenergan und Neo-Bridal konnten den Effekt der Histaminsalbenbehandlung *nicht* aufheben.

2. Die den Versuchstieren injizierte Tusche verschwindet normalerweise in 20—40 min aus dem Blut. In diesem Zusammenhang interessierte nicht der genaue Verlauf der Tuschekonzentrationskurve im Blut bis zum völligen Verschwinden, sondern für den Vergleich der einzelnen Substanzen war der Neigungswinkel der Kurven als Funktion der Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme von Bedeutung. Deshalb wurde der $\text{tg } \alpha = \frac{y}{x}$ berechnet. Beim Antistin, Urethan und Morphin verliefen die Kurven nicht gradlinig. Zur Vereinfachung wurde deshalb beim Antistin nur die Haupttrichtung berücksichtigt und beim Urethan und Morphin teilten wir die Kurven schematisch in 2 Phasen. Die abgebildeten Diagramme zeigen, daß der $\text{tg } \alpha$ bei den Kontrolltieren etwa 3 beträgt (Abb. 1) und sich auch nach Vorbehandlung mit Avil (Abb. 2), Neo-Bridal (Abb. 3) und Dabylen (Abb. 4) in dieser Größenordnung hält.

¹ Bei der Deutung der mikroskopischen Präparate haben uns Herr Prof. BRANDT (Freie Universität Berlin, Pathol. Abt. d. Städt. Krankenhauses Moabit) und sein Assistent Dr. SUCHOWSKI freundlicherweise beraten. Wir sind beiden Herren zu Dank verpflichtet.

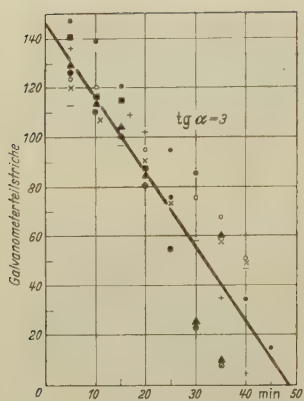


Abb. 1.

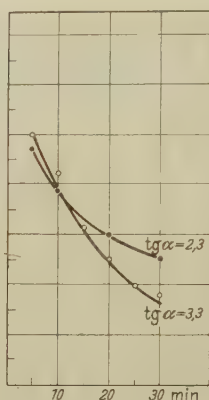


Abb. 2.

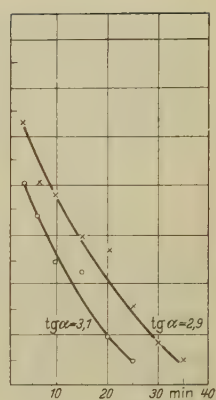


Abb. 3.

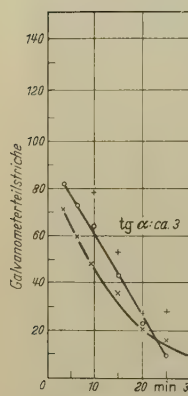


Abb. 4

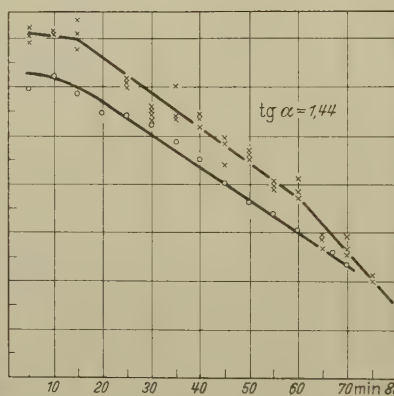


Abb. 5

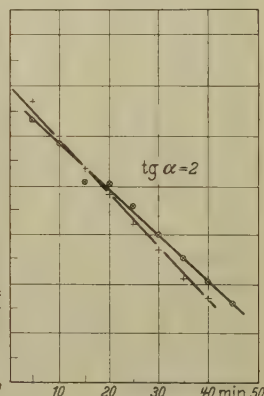


Abb. 6.

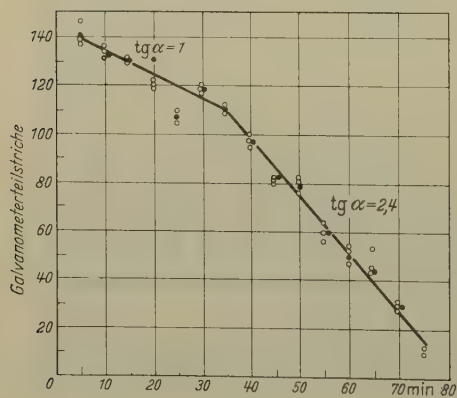


Abb. 7.

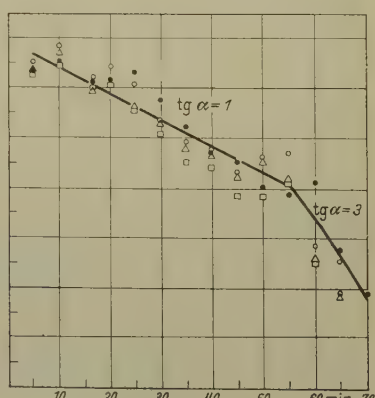


Abb. 8.

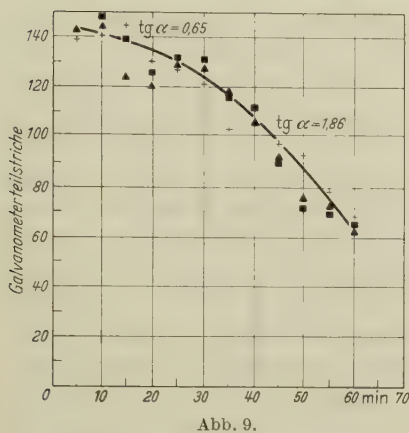


Abb. 9.

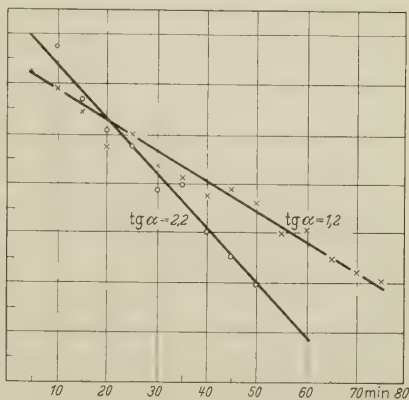


Abb. 10.

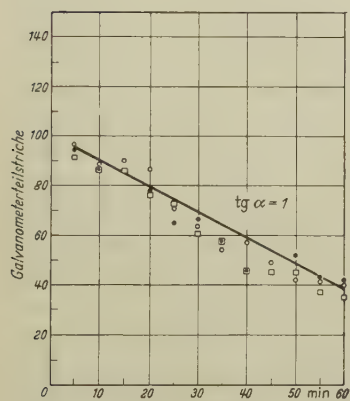


Abb. 11.

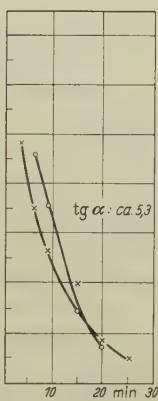


Abb. 12.

Abb. 1. Nicht vorbehandelt (8 Tiere).

Abb. 2. Nach Vorbehandlung mit 2×15 mg Avil/Tier s. c. (2 Tiere).

Abb. 3. Nach Vorbehandlung mit 2×10 mg Neo-Bridal/Tier s. c. (2 Tiere).

Abb. 4. Nach Vorbehandlung mit 2×15 mg Dabylen/Tier s. c. (3 Tiere).

Abb. 5. Nach Vorbehandlung mit 2×15 mg Antistin/Tier s. c. (2 Tiere).

Abb. 6. Nach Vorbehandlung mit 2×15 mg Phenergan/Tier s. c. (2 Tiere).

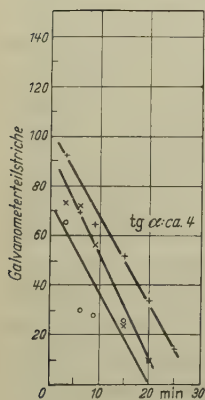


Abb. 13.

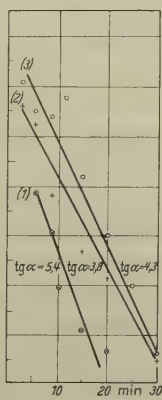


Abb. 14.

Abb. 7. Nach Vorbehandlung mit 7,5 mg Morphin HCl/100 g s. c. (4 Tiere).

Abb. 8. Nach Vorbehandlung mit 7,5 mg Evipan-Na/100 g i. p. (4 Tiere).

Abb. 9. Nach Vorbehandlung mit 0,15 g Urethan/100 g i. p. (3 Tiere).

Abb. 10. In Äthernarkose (2 Tiere).

Abb. 11. Nach Vorbehandlung mit 60 mg Bromural/100 g i. p. (3 Tiere).

Abb. 12. Nach Vorbehandlung mit 2×10 mg Pyribenzamin/Tier s. c. (2 Tiere).

Abb. 13. Nach Vorbehandlung mit 2×10 mg Tephroin/Tier s. c. (3 Tiere).

Abb. 14. Nach Vorbehandlung mit
1. 4 mg Histamindihydrochlorid/Tier s. c.
2. 0,1 mg Histamindihydrochlorid/Tier i. v.
3. 0,2 mg Histamindihydrochlorid/Tier i. v.

Unter Antistin (Abb. 5) und Phenergan (Abb. 6) ist dieser Wert wie bei den untersuchten narkotisch wirksamen Substanzen (Abb. 7—11) erheblich kleiner. Pyribenzamin (Abb. 12) und etwas weniger deutlich auch Thephorin (Abb. 13) verursachen einen steileren Kurvenabfall und ähneln damit den unter Histamin (Abb. 14) aufgenommenen Bildern.

3. Zunächst wurden einige Lebern mit der reinen Salzlösung unter Zusatz von 10% Rinderserum durchströmt, um Methodik und Verhalten der Leber zu prüfen. Es gelang etwa 80 min ohne Veränderung der Durchströmungsgeschwindigkeit und des Lebervolumens zu durchströmen. Dann wurden dieser Lösung 10% Tusche zugesetzt. Nach etwa 40 min begann spontan eine zunehmende Verminderung der Durchströmungsgeschwindigkeit und Zunahme des Organvolumens. Daran änderte der Zusatz von Antistin oder anderen Antihistaminica nichts. Durch Histamin trat diese Verminderung früher und stärker ein. Nach der Herausnahme aus dem Oncometer waren die Lebern gleichmäßig schwarz gefärbt, unabhängig davon, ob sie mit Histamin, Antistin oder ohne jeglichen Zusatz durchströmt worden waren. In den Trübungskurven zeigte sich regelmäßig parallel mit der verminderten Durchströmung ein Abfall der Tuschekonzentration. Beide Erscheinungen traten stets gemeinsam auf. Die von JANCsó beschriebene Hemmung der Speicherfunktion für Tusche unter der Einwirkung von Antistin konnte nicht gefunden werden. Von den Antihistaminica wurden Antistin, Avil, Thephorin und Neo-Antergan in Konzentrationen von 1:500, 1:1000, 1:2500 und 1:5000 geprüft. Histamin setzten wir 1:500, 1:1000 und 1:2500 der Salzlösung zu.

Diskussion der Ergebnisse.

Die von JANCsó mit Antistin erzielten Untersuchungsbefunde ließen sich zum Teil reproduzieren. An der isoliert durchströmten Leber sind wir allerdings zu anderen Ergebnissen gekommen. Unter der Einwirkung von Histamin blieben in der Leber Tuschepartikelchen zurück, d. h. die ausströmende Flüssigkeit wurde heller, aber gleichzeitig nahm unter Schwellung der Leber die Durchflußmenge erheblich ab. Daran ändert auch die Zugabe eines Antihistaminicums nichts. Die Lebergefäße — so kann man daraus schließen — werden während der Versuchsdauer durchlässiger, so daß Wasser und Tusche in das Gewebe austreten. Ein Teil des Wassers strömt natürlich wieder in die Gefäßbahn zurück, während die Tuscheteilchen dazu nicht in der Lage sind und extravasal liegen bleiben. Vom Histamin ist lange bekannt, daß es die Permeabilität der Capillaren erhöht und deshalb an diesem Versuchsobjekt das Auftreten eines Ödems erheblich fördert. Da aber die Tuschekonzentration nur abnimmt, wenn der Durchfluß vermindert wird, muß geschlossen werden, daß beide Vorgänge voneinander abhängig sind, der bestimmende Faktor jedoch in der Capillardurchlässigkeit liegt.

Der Schwund in die Blutbahn injizierter Tusche ist sicher in erster Linie von der Aktivität der Retikuloendothelien abhängig, denn Leber, Milz, Lunge und Knochenmark werden tiefschwarz gefärbt. Die Leukocyten phagocytieren in der kurzen Zeit entweder gar nicht, oder die mit Tusche beladenen Blutkörperchen verschwinden sofort aus dem strömenden Blut. In Ausstrichpräparaten waren keine mit Rußpartikelchen beladenen Leukocyten zu sehen. Deshalb wird man vermuten können, daß Arzneimittel, die den Tuscheschwund aus dem Blut verzögern oder beschleunigen, die Phagocytosefunktion der Retikuloendothelien verändern.

JANCsó hat in seiner Arbeit die lähmende Wirkung des Urethans auf das retikuloendotheliale System erwähnt. Tatsächlich verzögert Urethan erheblich den Tuscheschwund. Jedoch handelt es sich dabei nicht um eine nur dem Urethan zukommende Wirkung, sondern um ein allgemeines Begleitsymptom der Narkose, denn andere Narkotica rufen ähnliche Effekte hervor. Ebenso wirken die Antihistaminica Antistin und Phenergan, deren sedative Wirkungen besonders auffällig sind. Bei der Phenothiazinderivaten sind sie so stark, daß einige von ihnen in letzter Zeit in der Chirurgie zur Verstärkung narkotischer Wirkungen und in der Inneren Medizin und Psychiatrie zur Begünstigung des Schlafeintritts verwendet werden. Die erzielte Wirkung soll mehr dem natürlichen Schlaf ähneln, als dem durch Schlafmittel hervorgerufenen. Außerdem scheinen die Substanzen elektiv vegetative Zentren zu beeinflussen. Jedenfalls setzen sie die Körpertemperatur stärker herab als es ihrer narkotischen Wirkung entsprechen würde. Da einige andere Antihistaminica den Tuscheschwund nicht verzögerten, ist anzunehmen, daß nicht der Antihistamineffekt, sondern die narkotische Komponente dafür verantwortlich ist.

H. HOFMANN (1943) berichtete über permeabilitätsverändernde Wirkungen der Narkotica an der Froschhaut. Er fand bei narkotischen Dosen von Äthylurethan, Paraldehyd, Amylenhydrat, Chloralhydrat, Veronal und Luminal eine reversible Verminderung der Grenzflächendurchlässigkeit.

Andererseits ist es denkbar, daß in der Narkose auch die Phagocytoseaktivität herabgesetzt ist. Das könnte durch eine echte narkotische Wirkung auf die Retikuloendothelien zustande kommen, oder durch eine Stoffwechselstörung als Folge der Narkose bedingt sein.

Lediglich die Wirkung von Phenergan ist in der von uns angeführten Form schwer zu deuten, denn es verhindert nicht die Tuscheablagerung in der histaminbehandelten Haut, verzögert aber den Tuscheschwund aus dem Blut. Bei der Erklärung ist vielleicht zu berücksichtigen, daß Phenergan in so hohen Dosen wie sie hier verwendet wurden, bei Ratten mitunter auch Krämpfe auslösen, also erregend wirken kann.

Histamin selbst beschleunigt den Tuscheschwund aus dem Blut. Dieser Befund zwingt nicht zu der Annahme einer spezifischen Wirkung des Histamins auf retikuloendotheliale Zellen. In Verbindung mit den Versuchen an der Haut und den erwähnten Leberexperimenten liegt es näher, anzunehmen, daß auch hier die permeabilitätssteigernde Wirkung des Histamins der wesentliche Faktor ist. Auf dem Wege durch die Capillarwandung kommen die Rußpartikelchen in innigen Kontakt mit den Retikuloendothelien und werden dadurch der phagocytierenden Funktion dieser Zellen zugänglicher. Man könnte sich sogar vorstellen, daß der Kontakt zwischen Fremdkörper und Endothelien der adäquate Reiz für die Auslösung der Phagocytose ist.

Die Beschleunigung des Tuscheschwundes nach Vorbehandlung mit den erregend wirkenden Antihistaminica Thephorin und Pyribenzamin wird vielleicht durch die Befunde von PELLERAT (1945) erklärt. Danach erhöht die Applikation von Antergan oder Neo-Antergan die Histaminkonzentration des Blutes. Das könnte auch hier geschehen sein. Die Kurven wären dann Ausdruck einer sekundären Histaminwirkung wie es ihrem Verlauf entsprechen würde. Außerdem ist die permeabilitätssteigernde Wirkung erregender Pharmaka durch die schon zitierte Arbeit von H. HOFMANN bekannt.

JANCsó hat unseres Erachtens keine neue physiologische Wirkung des Histamins gefunden, denn die von ihm beschriebenen Effekte lassen sich mit den bekannten Wirkungen auf die Gefäße erklären. Er fand selbst, und wir können es bestätigen, daß nach Einreiben von Histamin in die Haut auch die darunter gelegenen Muskelschichten und sogar Darmabschnitte geschwärzt erscheinen. Man kann nicht annehmen, daß sich die Diffusion eines in die Haut applizierten Stoffes bis in die Eingeweide, durch mehrere Gewebsschichten und die freie Bauchhöhle hindurch, nur auf die Extracellulärflüssigkeit eines bestimmten Segmentes beschränkt. Diese Beobachtung weist eher auf eine nervale Ursache hin. Reflektorisch, wie bei jeder Hyperämiebehandlung der Eingeweide von der Haut aus, werden durch die Histamineinreibung auch die Gefäße der tieferen Schichten und der Eingeweide des entsprechenden Segmentes erweitert und durchlässiger. Dementsprechend sahen wir die Tuscheteilchen auch extracellulär und nicht, wie JANCsó meint, nur in den Endothelien. Natürlich war ihre Dichte in der Umgebung der Gefäße am größten.

JANCsó's Deutung hätte sich gut in die Befunde eingefügt, nach denen Histamin die phagocytierende Tätigkeit der *Leukocyten* steigert. Derartige hat außer einigen anderen Autoren auch H. O. LOOS (1931) mitgeteilt. Jedoch können wir aus unseren Versuchen nur annehmen, daß Histamin keine wesentliche Bedeutung für die Phagocytose durch *Retikuloendothelien* hat und auch keine ursächliche Rolle bei der Umwandlung der Capillarendothelien in phagocytierende Zellen spielt.

Zusammenfassung.

Es wurde geprüft, ob Histamin eine wesentliche Bedeutung als Wirkstoff für die Phagocytosefunktion von Endothelien besitzt.

1. In der Haut lagern sich Tuscheartikelchen, die ins Blut injiziert wurden, an den mit Histamin vorbehandelten Stellen ab. Durch Antistininjektionen konnte diese Histaminwirkung verhindert werden, nicht aber durch die Antihistaminica Thephorin, Avil, Pyribenzamin, Benadryl, Phenergan und Neo-Bridal. Im narkotischen und somnolenten Zustand, durch Urethan, Äther, Evipan, Bromural oder Morphin hervorgerufen, trat die Histaminwirkung wie nach Antistin nicht auf.

2. Der Schwund in die Blutbahn injizierter Tusche wurde durch Avil, Neo-Bridal und Dabylen nicht beeinflußt.

Die sedativ wirkenden Antihistaminica Antistin und Phenergan sowie die Narkotica Äther, Urethan, Evipan, Bromural und Morphin verzögerten den Tuscheschwund.

Histamin beschleunigte diesen Prozeß. Wir schließen daraus jedoch nicht auf eine spezifische Wirkung des Histamins für die Funktion des retikuloendothelialen Systems, sondern erklären den Befund mit einer gesteigerten Capillarpermeabilität. Versuche mit den erregend wirkenden Antihistaminica Thephorin und Pyribenzamin ergaben ebenfalls einen schnelleren Tuscheschwund.

3. An der isoliert durchströmten Leber nahm die Tuscheretention parallel zur Gefäßdurchlässigkeit zu.

Eine spezifische Mitwirkung des Histamins bei der Phagocytose von Endothelien wird abgelehnt.

Literatur.

HOFMANN, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **201**, 529 (1943). — JANCsó, M.: Histamine: Physiological Activator of the Reticulo-Endothelial System. Orvosok Lapja **1947**, III. 1025. — LOOS, H. O.: Z. exper. Med. **75**, 463 (1931). — PELLERAT, J.: Thesis (Lyon 1945) und Congrès méd. français, Paris oct. 1947 zit. bei C. P. HUTTNER, Recent progress in Histamine and Antihistamine Research. Experientia (Basel) **5/2**, 63 (1949). — RIECHERT, W., W. RAULE u. H. BÜCHNER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **201**, 57 (1943).

Privat-Dozent Dr. H. KEWITZ,
Pharmakologisches Inst. d. Freien Universität, Berlin-Dahlem.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. KUSCHINSKY).

Die Behandlung der experimentellen Quecksilbervergiftung mit 2,3 Dimercaptopropionsäure.

Von

G. KUSCHINSKY und E. MUSCHOLL.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Juni 1954.)

Das ursprünglich zur Behandlung der Schädigung durch Lewisit (Chlorvinyl-dichlorarsin) entwickelte 2,3 Dimercaptopropanol (BAL) (PETERS, STOCKEN u. THOMPSON) wurde in der Folgezeit auch bei anderen Schwermetallvergiftungen erprobt.

Die gute Lipidlöslichkeit des lokal angewandten BAL stellt bei der Verhütung und Behandlung von Hautschädigungen durch Lewisit einen wesentlichen Faktor dar. Bei der Therapie resorptiver Schwermetallvergiftungen wird BAL in ölgiger Lösung i.m. angewandt, da es in wäßriger Lösung nicht haltbar ist. RIKER fand an Katzen, die mit Mapharsen vergiftet waren, eine stärkere therapeutische Wirkung von BAL in ölgiger Lösung als in wäßriger. Wie GILMAN, ALLEN, PHILIPS u. JOHN zeigten, schützte BAL mit Sublimat vergiftete Kaninchen um so besser, je rascher die Behandlung einsetzte. Die Versuche, ein i.v. injizierbares und damit schneller zur Wirkung gelangendes Dithiol gegen die Arsenvergiftung zu finden, führten zur Entwicklung des BAL-Glucosids (DANIELLI, DANIELLI, FRASER, MITCHELL, OWEN u. SHAW). Diese Verbindung ist auch bei der tierexperimentellen Vergiftung durch Sublimat (GILMAN, ALLEN, PHILIPS u. JOHN) oder Cadmiumchlorid (GILMAN, PHILIPS, ALLEN u. KOELLE; TEPPERMAN) therapeutisch stärker wirksam als BAL. Die Reindarstellung und Haltbarmachung von BAL-Glucosid ist jedoch schwierig (STOCKEN u. THOMPSON) 1949). Ein anderes gut wasserlösliches Dithiol stellt die 2,3 Dimercaptopropionsäure (DMPS) dar, über die bereits einige Untersuchungen vorliegen: Nach STOCKEN u. THOMPSON (1946) schützt DMPS Succinoxidase gegen die Hemmung durch Lewisit, jedoch nicht so gut wie BAL. BARRON u. KALNITSKY fanden eine bessere Beseitigung der durch Wismut-, Quecksilber- und Cadmiumsalze hervorgerufenen Hemmung der Succinoxidase durch DMPS als durch BAL. Bei der Behandlung der Lewisitverätzung der Kaninchenhaut (FITZHUGH, WOODARD, BRAUN, LUSKY u. CALVERY) sowie der menschlichen Haut (THOMSON, SAVIT u. GOLDWASSER) wies DMPS gegenüber BAL keinen Unterschied auf. WEATHERALL u. WEATHERALL prüften an Mäusen und Ratten die Wirkung von Dithiolen auf die Vergiftung mit Phenylarsenoxyd. Hierbei war die Verabreichung von BAL günstiger als die von DMPS. Kurz vor Abschluß unserer Untersuchung wurden uns die Befunde von WELLENS bekannt, nach denen DMPS sublimatvergiftete Mäuse in einem höheren Prozentsatz als BAL schützt.

In unseren Versuchen wurde die Wirkung von Dimercaptopropionsäure (DMPS) und Dimercaptopropanol (BAL) auf die Sublimatvergiftung

verglichen und die Beeinflussung der durch toxische Salyrgandosen hervorgerufenen EKG- und Blutdruckveränderungen durch DMPS und andere Thiole geprüft.

Methodik.

Zu den von Dezember 1952 bis Februar 1954 durchgeführten Versuchen wurden 326 Mäuse (18—26 g), 20 Ratten, 22 Kaninchen und 4 Hunde verwendet. Da wir bei einigen Experimenten mit sublimatvergifteten Mäusen einen Einfluß des Geschlechtes auf die Toxizität beobachteten, werden nur Versuche mit männlichen sublimatbehandelten Mäusen wiedergegeben.

Folgende Substanzen wurden verwendet: Sublimat (Hydrarg. bichloratum „Merek“), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (0,1 ml/10 g Maus i.p.); theophyllinfreies Salyrgan (Natriumsalz des 3-Oxymercuri-2-methoxy-propylamids des Salicylsäureglykolsäureäthers)¹ in 10%iger Lösung; BAL (2,3 Dimercaptopropanol), die erforderlichen Konzentrationen wurden durch Verdünnen von Sulfactin „Homburg“² mit Erdnußöl frisch hergestellt (intraperitoneal 0,1 ml Lösung/10 g Maus; i.m. 0,05 ml pro 20 g Maus); 2,3 Dimercaptopropionsäure² stand in einer stabilen 10%igen Lösung vom pH 4,5 in Natriumacetatpuffer (15%ig) in Ampullen zur Verfügung. Die Verdünnung erfolgte frisch mit physiologischer Salzlösung oder aqua dest. (0,1 ml/10 g Maus i.p. oder s.c.; 0,05 ml/10 g Maus i.v.; 0,5 ml/100 g Ratte s.c. oder i.v.; 1 ml/Kaninchen oder Hund i.v.; Injektionsdauer bei i.v. Verabreichung an Mäuse und Ratten etwa 5 sec, an Kaninchen und Hunde 5—15 sec). Ferner gelangten 1-Cystein-HCl, Natriumthiosulfat und Adrenalin. hydrochl. (Suprarenin)¹ in frisch bereiteten wäßrigen Lösungen zur Verwendung. Die an Mäusen durchgeführten Toxizitätsbestimmungen und Versuche zur Behandlung der Sublimatvergiftung wurden bei einer Temperatur von 20—22° C durchgeführt. Die Tiere befanden sich auf einer Torfmullunterlage in Glasbehältern und erhielten bei den chronischen Versuchen Körner und Küchenabfälle sowie Trinkwasser ad libitum. Die Versuche zur Bestimmung der LD₅₀ wurden mit der Methode von LITCHFIELD u. WILCOXON ausgewertet.

Die Beeinflussung der durch Salyrgan hervorgerufenen Schädigung von Herz und Kreislauf wurde am Blutdruck und am EKG von Kaninchen und Hunden untersucht. Die Registrierung des EKG erfolgte in der II. Ableitung über einen Vorverstärker durch einen Kathodenstrahloszillographen. Zur Ableitung dienten Nadel-elektroden. Mit einer Kleinbildkamera wurden auf Kinofilm Einzelaufnahmen des Schirmbildes angefertigt.

Die Kaninchen erhielten zur Narkose entweder 150—200 mg Natrium phenyl-äthylbarbituric/kg langsam i.v. oder 1,2 g Urethan/kg i.p. oder 0,5 g Urethan/kg mit 40 mg Chloralose/kg i.v., die Hunde 20 mg Morphin. hydrochlor. und 1 g Urethan/kg i.p.

Die Messung des Blutdruckes wurde blutig mit dem Quecksilbermanometer an der Art. carotis (Kaninchen) oder der Art. femoralis (Hund) durchgeführt. Die Tiere erhielten zur Verhinderung der Blutgerinnung das Heparinoid Thrombocid³.

Zur Prüfung der Nierenfunktion wurde die Untersuchung des Urins auf Eiweiß (mit Sulfosalicylsäure) und Sedimente herangezogen. Nach Verabfolgung von

¹ Für Überlassung von Versuchsmengen danken wir den Farbwerken Hoechst, Frankfurt/M.-Höchst.

² Für Überlassung von Versuchsmengen danken wir der Firma Chemiewerk Homburg, Frankfurt/M.

³ Für Versuchsmengen danken wir der Firma Dr. Willi Benend, München.

Leitungswasser per os (3% des Körpergewichtes) wurden Ratten oder Mäuse einzeln in Diuresekäfige gesetzt und der Urin während 3—5 Std gesammelt.

Die histologische Untersuchung der Organe erfolgte nach Formolfixierung und Paraffineinbettung durch Färbung der Schnitte mit Eisenhämatoxylin (WEIGERT) und Erythrosin.

Versuchsergebnisse.

Akute Toxizität von DMPS. Die LD_{50} intraperitoneal zugeführter DMPS betrug an Mäusen 47,0 (37,6—58,7)¹ mg/kg (35 Tiere). Bei i.v. Gabe in eine Schwanzvene ergab sich an 40 Mäusen eine LD_{50} von 40,0 (34,7—46,0) mg/kg. Die toxischen Erscheinungen bestanden bei beiden Verabreichungsarten in Krämpfen, die einige Minuten nach der Injektion begannen. Im Laufe einiger Minuten trat dann der Tod im Streckkrampf ein. Geringere Dosen, die nicht zu Krämpfen führten, verursachten zuerst beschleunigte, dann verlangsamte Atmung. Die Tiere lagen flach ausgestreckt auf dem Boden und zogen bei Bewegungen oft die Hinterbeine nach. Innerhalb von 2 Std waren auch Mäuse, die Krämpfe gezeigt hatten, symptomfrei. Nach diesem Zeitpunkt trat bei den behandelten Tieren auch bei mehrtägiger Beobachtung kein Todesfall mehr auf.

Die Wirkung wiederholter Dosen von DMPS wurde wie folgt geprüft: 10 Mäuse erhielten in stündlichem Abstand 4mal i.v. und 2mal i.p. je 8,7 mg DMPS/kg (entspricht 22% der LD_{50}). Diese auf 6 Std verteilte Gabe einer Dosis, die 131% der LD_{50} beträgt, wurde von allen Tieren ohne auffällige Erscheinungen vertragen. Eine Dosis von 8,7 mg DMPS/kg wurde 10 weiteren Mäusen 4mal im Abstand von 30 min i.v. verabreicht. Die Tiere zeigten einige Minuten nach der zweiten bis vierten Gabe verminderte Motilität, schnappende Atmung, flach ausgestreckte Lage, aber keine Krämpfe.

Je 2 Kaninchen erhielten DMPS i.v. in verschiedenen Dosen: Bei Injektion von 21,7 mg/kg überlebten die Tiere; bei Gabe von 43,5 und 65,2 mg/kg starb je 1 Kaninchen im Streckkrampf. Die Verabreichung von 107 mg/kg an 1 Kaninchen führte zum Krampftod.

Akute Toxizität von BAL. An Mäusen wurde die LD_{50} von i.p. verabfolgtem BAL zu 103 (87—122) mg/kg und i.m. injiziertem zu 113 (102—126) mg/kg bestimmt. Die Vergiftungszeichen entsprachen den für DMPS geschilderten, traten aber erst nach 20—40 min auf und hielten für Stunden.

Chronische Verträglichkeit von DMPS. Die Wirkung einer chronischen Gabe von DMPS wurde an 10 Ratten untersucht. Die Tiere erhielten täglich 20 mg DMPS/kg während 4 Wochen subcutan unter die Nackenhaut. Abgesehen von einigen bald resorbierten Spritzenabszessen zeigten die Tiere keine Unverträglichkeitserscheinungen. Anschließend wurden

¹ 95% Vertrauensgrenzen

4 Ratten getötet und Leber, Nieren, Milz und Herz histologisch untersucht¹. An den Nieren traten gegenüber 6 unbehandelten Kontrolltieren Schwellung und Blutfülle der Glomeruli sowie geringfügige Vermehrung mehrkerniger Hauptstücksepithelien auf. In den Tubuluslumina fanden sich etwas häufiger Eiweißniederschläge als bei den Kontrolltieren. Pathologische Veränderungen konnten in keinem Organ festgestellt werden. Die restlichen 6 Ratten wurden weitere 14 Wochen beobachtet und anschließend histologisch untersucht. Abgesehen von einer Vermehrung der Zellkerne in den Nierentubuli fanden sich in diesem Organ sowie in Milz und Leber keine histologisch faßbaren Veränderungen. Der Gewichtsanstieg der Ratten war während des 18wöchigen Versuchs normal.

Der Einfluß von DMPS auf die Niere. Die Untersuchung von DMPS auf Funktion und histologisches Bild der Niere erfolgte an Mäusen und Ratten. An 18 Mäusen wurden zunächst 3 Diureseversuche durchgeführt. Dann erhielten 6 Tiere insgesamt 120 mg DMPS/kg i.v. in 6 Dosen zu je 20 mg/kg über 36 Std verteilt; 6 Mäusen wurde in dem gleichen Zeitraum in 6 Dosen 85 mg/kg und 6 Tieren das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung i.v. verabreicht. In wöchentlichem Abstand erfolgten während der 5wöchigen Beobachtungszeit Diureseversuche. In keinem Fall ergab sich eine Verstärkung der vor Versuchsbeginn sowie bei den Kontrollen vorhandenen geringfügigen Proteinurie. Störungen der Wasserausscheidung oder Auftreten von pathologischen Sedimenten waren nicht festzustellen. Während des Versuches starben aus unbekannter Ursache 2 der behandelten und 2 Kontrolltiere. Die histologische Untersuchung der Nieren der in regelmäßigen Abständen getöteten Tiere ergab in den ersten 2 Wochen nach der Behandlung Schwellung der Glomeruli, an den Tubuli Abblassung der Kerne und des Protoplasmas, die Epithelien der Hauptstücke zeigten radiäre Körnerstruktur. In der folgenden Zeit traten vergrößerte Kerne der Glomeruli auf. Die Kerne der Tubulusepithelien waren vermehrt und wurden teilweise abgestoßen. Das histologische Bild erschien am Ende des Versuches wieder normal. DMPS bewirkte somit in beiden Dosierungen eine erkennbare, wenn auch geringfügige Schädigung, die nach verstärkter Regeneration ausgeglichen wurde.

6 männliche und 4 weibliche Ratten wurden in derselben Weise wie die Mäuse auf Wasserausscheidung, Eiweiß- und Sedimentgehalt des Urins untersucht. In 6 Einzeldosen zu je 20 mg DMPS/kg erhielten 8 Tiere insgesamt 120 mg/kg über 36 Std verteilt. 2 Tiere dienten nach i.v. Injektion eines entsprechenden Volumens physiologischer Kochsalzlösung als Kontrollen. Gelegentlich traten Eiweißspuren im Urin auf,

¹ Für Unterstützung bei der histologischen Auswertung danken wir Herrn Dr. med. TH. PETERS, Anatom. Inst. der Universität Mainz.

die auch vor Behandlungsbeginn und bei den Kontrollen nachzuweisen waren. Eine Störung der Wasserausscheidung oder ein pathologischer Sedimentbefund wurde nicht beobachtet, die Zunahme des Körpergewichtes verlief normal. Die histologische Prüfung ergab an den Nieren in der ersten Woche nach der Behandlung angeschwollene Glomeruli, in den Hauptstücklumina etwas stärkeren Eiweißgehalt, einzelne Tubuluszellen wiesen hyaline Tropfen auf. Die Erscheinungen traten in der folgenden Beobachtungszeit zurück.

Behandlung der Sublimatvergiftung mit DMPS und BAL. An 24 Mäusen wurde die LD_{50} für i.p. verabfolgtes Sublimat bei 12tägiger Beobachtung zu 4,3 (2,8—6,7) mg/kg bestimmt. Bei den Versuchen zur Behandlung der Sublimatvergiftung wurde sämtlichen Tieren 7,5 mg $HgCl_2$ /kg (entspricht der LD_{85}) gegeben. Verabreichungsart, -menge und -häufigkeit von BAL und DMPS sowie weitere Einzelheiten sind der Tab. 1 zu entnehmen. Die Dosis 25 mg BAL/kg i.m. bzw. 8,7 mg DMPS/kg i.v. beträgt jeweils 22% der LD_{50} von BAL bzw. DMPS. Da die Wirkung von DMPS weniger lange anhält, kann diese Substanz in kürzeren Abständen verabreicht werden als BAL. Die Sublimatvergiftung konnte sowohl bei vor- als auch bei gleichzeitig einsetzender Behandlung durch DMPS praktisch ebenso günstig wie durch BAL beeinflußt werden. Bei subcutaner Verabreichung (unter die Nackenhaut) entfaltete DMPS aber nur eine ungenügende Schutzwirkung. Durch i.v. Gabe von 8,7 mg DMPS/kg sofort nach der Sublimatverabreichung konnte die Wirksamkeit der BAL-Behandlung nicht weiter gesteigert werden.

Beeinflussung der durch Salyrgan hervorgerufenen Herzschiädigung. Zur Darstellung möglichst schnell einsetzender Entgiftungsvorgänge versuchten wir, eine akute, gut reproduzierbare Schädigung durch Quecksilber hervorzurufen und den Einfluß von DMPS darauf zu prüfen.

Die i.v. Injektion von 10—20 mg Salyrgan/kg in eine Ohr- oder Beinvene verursachte an narkotisierten Kaninchen folgende Veränderungen des EKG, II. Ableitung: Verbreiterung des QRS-Komplexes, tiefer Abgang, eventuelle Senkung der Mittelstrecke, Erhöhung von T. Bei höheren Dosen (20—50 mg/kg) trat Aufsplitterung, periodisches oder dauerndes Aussetzen des Kammerkomplexes, gelegentlich Kammerflattern oder -flimmern auf. Die P-Zacken waren auch nach Aufhören der Kammerkomplexe noch etwa 1 min zu registrieren. Die Herzfrequenz wurde nur von den höheren Dosen nennenswert verändert, meist verlangsamt. Da die Injektionsgeschwindigkeit des Salyrgan auf das Ausmaß der EKG-Veränderungen von Einfluß war, wurde sie konstant bei 2 sec pro Dosis gehalten. Sofern eine Dosis von 10—30 mg Salyrgan/kg gegeben wurde, hielten die Veränderungen am EKG einige Minuten an und bildeten sich im Lauf von 10—15 min zurück. An einem Tier

konnten in $\frac{1}{2}$ stündigem Abstand mehrere Injektionen vorgenommen werden; die EKG-Veränderungen wurden bei aufeinanderfolgenden Salyrgangaben nachhaltiger.

Tabelle 1. *Der Einfluß von DMPS und BAL auf die Zahl der eine Sublimatvergiftung überlebenden Mäuse.*

HgCl ₂	Zahl der Tiere	Behandlung	Ver- suchs- dauer Tage	Überlebende Tiere
7,5 mg/kg i.p.	10	—	12	3 = 30%
7,5 mg/kg i.p.	14	20 mg BAL/kg i.p. 1 Std vor, $1\frac{1}{2}$, $6\frac{1}{2}$ Std, 1 u. 2 Tage nach HgCl ₂	12	8 = 57%
7,5 mg/kg i.p.	12	8,7 mg DMPS/kg i.p. $\frac{1}{2}$ Std vor, $\frac{1}{2}$, 3 Std, 1 u. 2 Tage nach HgCl ₂	12	8 = 66%
7,5 mg/kg i.p.	10	—	14	0 = 0%
7,5 mg/kg i.p.	18	20 mg BAL/kg i.m. gleichzeitig, 2 Std, 1, 2 u. 3 Tage nach HgCl ₂	14	8 = 44%
7,5 mg/kg i.p.	18	8,7 mg DMPS/kg s.c. gleichzeitig, 1 Std, 1, 2 u. 3 Tage nach HgCl ₂	14	3 = 17%
7,5 mg/kg i.p.	11	—	15	2 = 18%
7,5 mg/kg i.p.	14	25 mg BAL/kg i.m. gleichzeitig, 1 Std, 1, 2 u. 3 Tage nach HgCl ₂	15	11 = 79%
7,5 mg/kg i.p.	14	8,7 mg DMPS/kg i.v. gleichzeitig, $\frac{1}{2}$, $1\frac{1}{2}$, 5 Std, 1, 2 u. 3 Tage nach HgCl ₂	15	12 = 86%
7,5 mg/kg i.p.	17	25 mg BAL/kg i.m. gleichzeitig, 3 Std, 1, 2 u. 3 Tage nach HgCl ₂ 8,7 mg DMPS/kg i.v. gleichzeitig mit HgCl ₂	15	13 = 76%

Mit Hilfe von BAL (20 mg/kg 1 Std zuvor i.m.) oder DMPS (8,7 mg/kg, unmittelbar zuvor bis 2 Std vorher) ließen sich die durch Salyrgan hervorgerufenen Erscheinungen am EKG unterdrücken. BAL oder DMPS hatten selbst keinen nachweisbaren Einfluß auf das EKG. Wurde im Anschluß an die Salyrgangabe 8,7 mg DMPS/kg i.v. injiziert, so erfolgte während 10—30 sec eine Rückbildung der Veränderungen zu dem Ausgangs-EKG. Auch Dosen von Salyrgan, die ohne Behandlung fast immer zum Herzstillstand führten (40—50 mg/kg), wurden mit Hilfe von nachfolgend verabreichter DMPS toleriert.

Adrenalin (70 γ /kg i.v.) beeinflusste das EKG nach Salyrgan kurzfristig im Sinne weniger schwerer Veränderungen; der Effekt war wesentlich schwächer als der nach DMPS. Unterdrückung bzw. Aufhebung der nach Salyrgan am EKG beobachteten Erscheinungen konnte auch durch Cystein (100 mg/kg i.v.) oder weniger gut durch Natriumthiosulfat (100 mg/kg i.v.) erzielt werden. In der beschriebenen Weise wurden an 10 Kaninchen 59 Injektionen von Salyrgan durchgeführt und in 28 Versuchen die Wirkung einer der genannten Substanzen geprüft.

Beeinflussung der Blutdrucksenkung nach Salyrgan durch DMPS und Cystein. Gleichzeitige Registrierung von EKG und arteriellem Blutdruck wurde an 5 Kaninchen und 4 Hunden durchgeführt. Eine i.v. Gabe

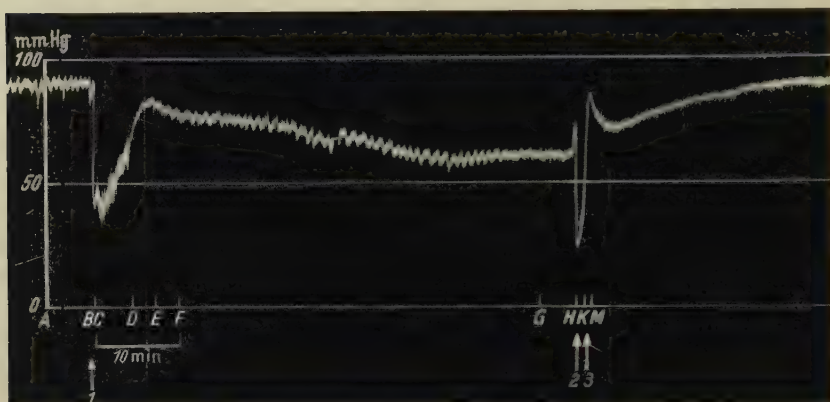


Abb. 1. Kaninchen, 2,2 kg, 180 mg Na-phenyläthylbarbituric/kg, Druck der Art. carotis. 1 und 2: 30 mg Salyrgan/kg i.v.; 3: 8,7 mg DMPS/kg i.v.; 1 min nach 1. A—M: EKG-Aufnahmen, siehe Abb. 2.

(5—15 sec) von 8,7 mg DMPS/kg verursachte bei beiden Tierarten eine sofortige Blutdrucksenkung von 10—30 mm Hg. Im Lauf von 5—10 min stieg dann der Blutdruck wieder bis zu dem Ausgangsniveau. Wurde DMPS innerhalb von 3 Std ein zweites Mal gegeben, erfolgte der Wiederanstieg des Blutdruckes in 10—30 min. Eine 2 min dauernde Infusion von 8,7 mg DMPS/kg hatte keinen Einfluß auf den Blutdruck.

Salyrgan (10—30 mg/kg i.v.) verursachte einen Abfall des Blutdruckes, der je nach Dosis und Zustand des Tieres (Ausgangsbloodruck, Wirkung vorheriger Salyrgangaben) 30—80 mm Hg betrug (Abb. 1). Die oben beschriebenen EKG-Veränderungen konnten gleichzeitig registriert werden (Abb. 2). Oft ging dem Absinken des Blutdruckes ein kurzer Anstieg voraus. Wenn das EKG nach einigen Minuten sich normalisiert hatte, war auch der Blutdruck soweit wieder angestiegen, daß er nur noch 10—20 mm Hg unter dem ursprünglichen Niveau lag. Außer dieser kurzdauernden und fast voll reversiblen Senkung des Blutdruckes konnte eine längerdauernde beobachtet werden. Diese betrug

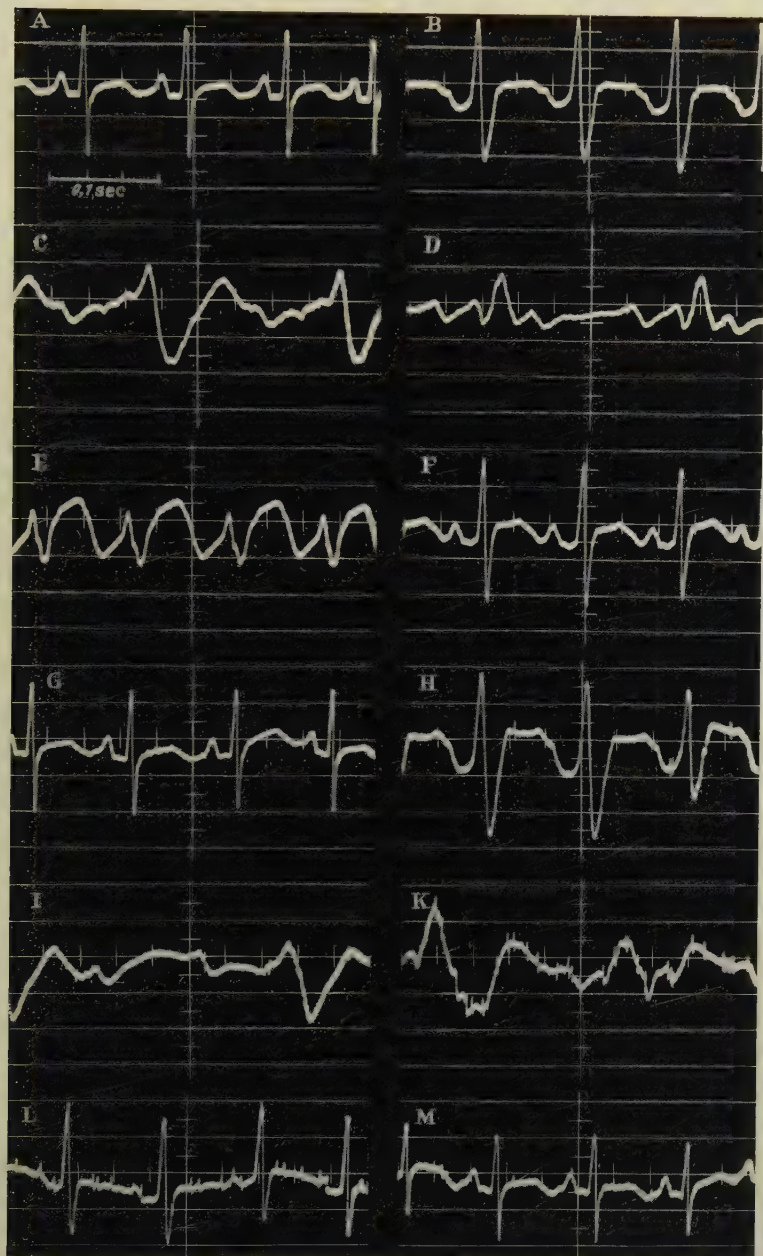


Abb. 2. EKG, II. Ableitung. Gleichzeitig mit dem Blutdruck (siehe Abb. 1) registriert. A vor, B 15 sec, C 30 sec, D 4 min, E 7 min, F 10 min nach 30 mg Salyrgan/kg i.v. G normales EKG, 45 min nach F, H 10 sec, I 20 sec, K 1 min 15 sec nach 30 mg Salyrgan/kg, 15 sec nach 8,7 mg DMPS/kg i.v. L 1 min 20 sec nach Salyrgan, 20 sec nach DMPS, M 1 min 45 sec nach Salyrgan, 45 sec nach DMPS.

bis 50 mm Hg, erfolgte langsam und zeigte wenig Neigung zum spontanen Rückgang (siehe auch Abb. 1). Die Injektion von 8,7 mg DMPS/kg während der initialen Blutdrucksenkung durch Salyrgan machte diese innerhalb $\frac{1}{2}$ min rückgängig. Dieser Wirkung ging stets die Normalisierung des EKG voraus. DMPS beeinflusste auch den langsamen Blutdruckabfall. Wenn dieser noch nicht eingesetzt hatte, konnte er durch DMPS verhindert werden; wenn der Blutdruck einige Zeit abgesunken war, bewirkte DMPS im Laufe von 20–40 min Rückkehr zum Ausgangswert (Abb. 1). Eine Dosis von 8,7 mg DMPS/kg unterdrückte während dreier Stunden die Wirkung mehrerer Gaben von 20 mg Salyrgan/kg. Erst nach dieser Zeit trat der am unbehandelten Tier sichtbare Effekt des Salyrgan auf Blutdruck und EKG zunehmend wieder auf.

Cystein (100 mg/kg i.v.) vermochte fast ebenso wirksam wie DMSP die akute Blutdrucksenkung nach Salyrgan (entsprechend der schnellen Beseitigung der EKG-Veränderungen) rückgängig zu machen. Auf die Ausbildung des langsam einsetzenden Blutdruckabfalles hatte es keinen Einfluß.

Ein nennenswert verschiedenes Verhalten von Hunden und Kaninchen bezüglich der mitgeteilten Befunde oder ein Einfluß der Narkoseart konnte nicht beobachtet werden.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Bestimmung der LD_{50} von BAL (i.p. 103 mg/kg; i.m. 113 mg/kg) lieferte Werte, die mit denen anderer Autoren übereinstimmen: GRAHAM u. HOOD fanden an Mäusen bei intraperitonealer Verabreichung als LD_{50} 100 mg/kg, LINDLAR 105 mg/kg, WELLENS 110 mg/kg sowie WEATHERALL u. WEATHERALL bei i.m. Injektion eine LD_{50} von 124 mg/kg. Die für DMPS ermittelte LD_{50} (i.p. 47 mg/kg, i.v. 40 mg/kg) ist praktisch der von WELLENS ebenfalls an Mäusen bestimmten (i.p. 50 mg/kg) gleich. DMPS ist an der Maus etwa doppelt so toxisch wie BAL. An der Ratte fanden FITZHUGH, WOODARD, BRAUN, LUSKY u. CALVERY bei i.m. Injektion von BAL bzw. DMPS (beide Substanzen in Äthylenglykol gelöst) eine LD_{50} von 105 mg/kg bzw. 83 mg/kg. Die gegenüber BAL kürzer dauernden Vergiftungserscheinungen bei Injektion von DMPS lassen eine häufigere Gabe dieser Substanz zu: Während die von der Maus maximal tolerierte BAL-Dosis (6×20 mg/kg i.m. in 2stündlichem Abstand) bereits toxische Erscheinungen macht (TOBIAS, LUSHBAUGH, PATT, POSTEL, SWIFT u. GERARD), konnten wir bei der 6maligen stündlichen Verabreichung von 8,7 mg DMPS/kg (i.v.) keine Vergiftungszeichen bemerken. Die über 12 Std verteilte Menge von BAL stellte 106%, die innerhalb von 6 Std gegebene Dosis von DMPS 131% der jeweiligen LD_{50} dar.

Nach chronischer Zufuhr sowie nach kurzdauernder Gabe hoher Dosen von DMPS an Ratten und Mäuse konnten wir bei mehrwöchiger bzw. -monatiger Beobachtungszeit keine Schädigungen der Tiere gesehen werden. WELLENS fand an 4 Mäusen, die in 48 Std insgesamt 85 mg DMPS/kg i.p. erhalten hatten, nach 2 und 4 Wochen histologische Veränderungen der Niere. Diese gleichen Veränderungen, die bei DMPS-behandelten, sublimatvergifteten Mäusen auftraten und als progrediente Nierenschädigung vom nephrotischen Typ als Folge der DMPS-Gabe angesehen wurden. WELLENS hob den Gegensatz dieser Veränderungen zu dem über 10 Wochen beobachteten guten Allgemeinzustand der Tiere hervor. Die Prüfung von Wasser- ausscheidung, Eiweißgehalt und Sedimenten des Urins lieferte uns bei Ratten und

Mäusen keinen Anhalt für das Vorliegen einer funktionellen Nierenschädigung nach Verabreichung von 85 bzw. 120 mg/DMPS/kg innerhalb von 36 Std. An den Nieren unserer Versuchstiere zeigte sich im histologischen Bild jedoch eine vorübergehende leichte Schädigung, die Glomeruli und Tubuli betraf und zu einer verstärkten Regeneration der Zellen führte.

Die bekannte entgiftende Wirkung von BAL bei der experimentellen Sublimatvergiftung (Übersicht bei STOCKEN u. THOMPSON 1949) konnte auch unter unseren Versuchsbedingungen erhalten werden. Hinsichtlich der Verträglichkeit entsprechende Dosen von BAL und DMPS zeigten keinen Unterschied in der Wirksamkeit gegen Sublimat, wenn DMPS intraperitoneal und i.v. gegeben wurde. Subcutane Verabreichung war für die Behandlung weniger zweckmäßig. Ähnliche Resultate erhielt WELLENS an einer größeren Anzahl von Mäusen, die mit 8 mg Sublimat/kg vergiftet waren: BAL schützte 20–40% der Tiere, DMPS sogar 20–95%.

Die EKG-Veränderungen, die wir nach i.v. Verabreichung von Salyrgan an Kaninchen registrierten, entsprachen auch im Hinblick auf ihre Beeinflussbarkeit durch BAL oder Cystein den in der Literatur bei Gabe quecksilberhaltiger Diuretika beschriebenen: LONG u. FARAH; LEHMAN; RUSKIN u. JOHNSON; QUIVY u. GAYET-HALLION. Die Herzschrägung besteht nach diesen und unseren EKG-Befunden in Rhythmus-, Reizbildungs- und -ausbreitungsstörungen. Die Erscheinungen am EKG konnten durch DMPS ebenso wie durch BAL verhindert bzw. aufgehoben werden. Wenn auch Monothiole (in unseren Versuchen Cystein und in geringerem Maße Natriumthiosulfat) in der Lage sind, die durch Quecksilberdiuretika hervorgerufenen Herzwirkungen zu beheben, so hemmen sie deren Wirkung z. B. nicht an der Niere (HANDLEY u. LA FORGE; FARAH u. MARESH; FARAH, COBBEY u. MOOK). Wie diese Autoren sowie SUSSMAN u. SCHACK nachwiesen, wird die Diurese durch organische Quecksilberpräparate bei der Verabreichung von BAL aufgehoben. In unseren Versuchen ließ sich ein über die Wirkung der Monothiole Cystein und Natriumthiosulfat hinausgehender Effekt der Dithiole BAL und DMPS am Blutdruck zeigen: Während die kurzdauernde, mit starken EKG-Veränderungen einhergehende Blutdrucksenkung nach Salyrgan durch die Mono- und Dithiole etwa gleichartig aufzuheben war, konnte der langdauernde Abfall des Blutdruckes nur durch BAL oder DMPS unterdrückt, durch DMPS auch rückgängig gemacht werden. Der Angriffspunkt des Salyrgan bei dem langdauernden Blutdruckabfall wurde von uns nicht näher untersucht; an dem EKG zeigten sich in diesem Stadium keine Veränderungen mehr.

Bei unseren Versuchen erwies sich die Möglichkeit der i.v. Anwendung von DMPS als ein Vorteil. Die Flüchtigkeit der Vergiftungssymptome erlaubte eine häufigere Gabe von Dosen, die unterhalb einer toxischen lagen, als bei BAL. Ob die zusätzliche Verabreichung von DMPS bei der Behandlung der Sublimatvergiftung mit BAL zu günstigeren Ergebnissen führt, konnte nicht sicher entschieden werden.

Zusammenfassung.

Die Wirkungen von 2,3 Dimercaptopropionsäure (DMPS) und 2,3 Dimercaptopropanol (BAL) auf die Sublimatvergiftung der Maus wurden miteinander verglichen. Ferner wurde an Kaninchen und Hunden der Einfluß von DMPS und anderen Substanzen auf die akuten, durch das Natriumsalz des 3-Oxymercuri-2-methoxy-propylamids des Salicylsäureglykolsäureäthers = Salyrgan an Herz und Blutdruck hervorgerufenen Veränderungen untersucht.

Unter anderen ergaben sich folgende Befunde:

1. Die LD_{50} von DMPS an Mäusen betrug 47 mg/kg i.p. bzw. 40 mg/kg i.v., die von BAL 103 mg/kg i.p. bzw. 113 mg/kg i.m. 6malige, stündliche Gabe von 22% der LD_{50} von DMPS rief keine Vergiftungssymptome hervor.

2. Intravenöse Gabe von 8,7 mg DMPS/kg (5—15 sec) bewirkte an Kaninchen und Hunden eine kurzdauernde Blutdrucksenkung von 10—30 mm Hg.

3. Die Verträglichkeit einer chronischen Gabe von DMPS an Ratten (4 Wochen 20 mg/kg/Tag) sowie kurzdauernder Verabreichung (in 36 Std insgesamt 120 mg/kg) an Ratten und Mäuse wurde durch Gewichtsbestimmungen, Diureseversuche und histologische Untersuchung der Organe geprüft. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede gegenüber Kontrolltieren.

4. Die Sublimatvergiftung der Maus konnte, bezogen auf gleich verträgliche Dosen, durch DMPS (i.p.; i.v.) in demselben Maß wie durch BAL (i.p., i.m.) günstig beeinflusst werden.

5. An Kaninchen und Hunden wurde durch Salyrgan (10—50 mg/kg i.v.) ein mit EKG-Veränderungen einhergehender Blutdruckabfall hervorgerufen. Nach Rückgang dieser Erscheinungen trat eine langdauernde Senkung des Blutdruckes auf. Vorherige Gabe von DMPS (i.v.) oder BAL (i.m.) unterdrückte diese Wirkungen des Salyrgan. DMPS und Cystein beseitigten fast momentan die EKG- und kurzdauernden Blutdruckveränderungen, DMPS im Gegensatz zu Cystein auch den langanhaltenden Blutdruckabfall.

Literatur.

- BARRON, E. S. G., and G. KALNITSKY: The inhibition of succinoxidase by heavy metals and its reactivation with dithiols. *Biochemic. J.* **41**, 346 (1947). — DANIELLI, J. F., M. DANIELLI, J. B. FRASER, P. D. MITCHELL, L. N. OWEN and G. SHAW: BAL-Intrav.: A new non toxic thiol for intravenous injection in arsenical poisoning. *Biochemic. J.* **41**, 325 (1947). — FARAH, A., T. S. COBBEY and W. MOOK: Concentration changes in urinary electrolytes produced by mercurial diuretics. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **81**, 601 (1951). — FARAH, A., and G. MARESH: Influence of SH-compounds on diuretical and renal and cardiac circulatory changes caused by mersalyl. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **92**, 73 (1948). — FITZHUGH, O. G., G. WOODARD, H. A. BRAUN, L. M. LUSKY and H. O. CALVERY: The toxicities of compounds related to BAL with a note on their relative therapeutic efficiency. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **87**, Suppl. 23 (1946). — GILMAN, A., R. P. ALLEN, F. S. PHILIPS and E. ST. JOHN: Clinical uses of BAL. *J. Clin. Invest.* **25**, 549 (1946). — GILMAN, A., F. S. PHILIPS, R. P. ALLEN and E. S. KOELLE: The treatment of acute cadmium intoxication in rabbits with BAL and other mercaptans. *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **87**, Suppl. 85 (1946). — GRAHAM, J. D. P., and J. HOOD: Actions of British Anti-Lewisite. *Brit. J. Pharmacol.* **3**, 84 (1948). — HANDLEY, C. A., and M. LA FORGE: Effect of thiols on mercurial diuresis. *Proc.*

Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 74 (1947). — LEHMAN, R. A.: Furthers studies on the acute toxicity of mercurial diuretics. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 428 (1947). — LINDLAR, F.: Die Behandlung der experimentellen akuten Thalliumvergiftung mit BAL. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 288 (1953). — LITCHFIELD, J. T. jr., and F. WILCOXON: A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1948). — LONG, W. K., and A. FARAH: The influence of certain SH-compounds on the toxicity of an organic mercurial diuretic. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **88**, 388 (1946). — PETERS, R. A., L. A. STOCKEN and R. H. S. THOMPSON: British Anti-Lewisite. Nature (Lond.) **156**, 616 (1945). — QUIVY, D., et TH. GAYET-HALLION: Sur la neutralisation, par le dimercaptopropanol, des troubles cardiaques déclenchés chez le chien par un organo-mercuriel. C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1572 (1953). — RIKER, W. F.: The treatment of experimental arsenic poisoning with the dithiols. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, Suppl. 66 (1946). — RUSKIN, A., and L. F. JOHNSON: Cardio-depressive effects of thiomerein: cardioprotective attempts with BAL, ascorbic acid and thiamin. — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **72**, 572 (1949). — STOCKEN, L. A., and R. H. S. THOMPSON: British Anti-Lewisite II Dithiol compounds as antidotes for arsenic. Biochemic. J. **40**, 535 (1946). — STOCKEN, L. A., and R. H. S. THOMPSON: Reactions of British Anti-Lewisite with arsenic and other metals in living systems. Physiologic. Rev. **29**, 168 (1949). — SUSSMAN, R. M., and J. A. SCHACK: BAL-inhibition of mercurial diuresis in congestive heart failure. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **66**, 247—248 (1947). — TEPPERMAN, H. E.: The effect of BAL and BAL-glucoside therapy on the excretion and tissue distribution of injected cadmium. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 343 (1947). — THOMSON, J. F., J. SAVIT and E. GOLDWASSER: Tests of 2,3 dimercaptopropanol and related dithiols for decontamination of lewisite in human skin. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 1 (1947). — TOBIAS, J. M., C. C. LUSHBAUGH, H. M. PATT, S. POSTEL, M. N. SWIFT and R. W. GERARD: The pathology and therapy with BAL of experimental cadmium poisoning. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, Suppl., 102 (1946). — WEATHERALL, J. A. C., and M. WEATHERALL: The effect of dithiols on survival time in rats and mice poisoned with organic arsenicals. Brit J. Pharmacol **4**, 260 (1949). — WELLENS, W.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Behandlung der Quecksilbervergiftung. Inaug. Diss. Med. Köln 1954.

Prof. Dr. G. KUSCHINSKY, Mainz, Pharm. Inst. d. Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg
(Prof. Dr. med. ED. KEESER).

Zur Histochemie der sogenannten experimentellen Arteriosklerose.

Von
K.-F. BENITZ.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 2. Juli 1954.)

Die Prüfung antisklerotisch wirkender Arzneimittel stellt die experimentelle Pharmakologie vor die Aufgabe, Gefäßveränderungen zu erzeugen, die morphologisch der menschlichen Arteriosklerose möglichst ähnlich sind und deren Pathogenese dem Ablauf der Humanerkrankung annähernd entspricht.

Die Vermehrung der interfibrillären Grundsubstanz ist als eine der ersten morphologisch faßbaren Erscheinungen für die Genese der Humanarteriosklerose besonders bedeutungsvoll und nach W. W. MEYER als Präsklerose anzusehen. Es kommt hierbei zu einer Einlagerung von lipoidarmen Stoffen, die sich metachromatisch anfärben lassen, also nach HOLMGREN u. SYLVEN veresterte Polysaccharidkomplexe enthalten. Diese Substanzen sind von JOEL u. HOPPS kürzlich in arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten auch histochemisch dargestellt worden, und es erscheint daher erforderlich zu untersuchen, ob sich bei einer experimentellen Arteriosklerose ähnliche Stoffe nachweisen lassen.

Wenn auch nach W. W. MEYER die Cholesterin-Fütterungsatheromatose des Kaninchens kein geeignetes Modell für die menschliche Erkrankung darstellt, so kann doch nach den Untersuchungen von GOFMANN, KEESER und KROETZ die ätiologische Bedeutung der Lipoproteide nicht bestritten werden. Weiter spielen nach THAUER und NORDMANN vasomotorische Einflüsse eine Rolle. Durch nervöse Fehlregulationen kommen Schwankungen der Blutdruckamplitude zustande, die zu Störungen in der Gefäßwandernährung und zur Hyp- bzw. Anoxie führen, die ebenfalls morphologische Schäden am Arterienrohr zur Folge haben können. Es sei z. B. auf die Versuche von WATERMANN hingewiesen, der durch Gaben von Adrenalin und Nitrit eine Arteriosklerose erzeugen konnte, die auf einen abnormen Kontraktionsablauf mit konsekutiver Störung der plasmatischen Gefäßwanddurchrieselung zurückzuführen sein dürfte.

Um den ätiologisch bedeutsamen blutchemischen und nervös-regulatorischen Faktoren bei der Entstehung der Arteriosklerose Rechnung zu tragen, wurden Gaben von Adrenalin mit einer geringen oralen

Zufuhr von Cholesterin kombiniert. Nach MENSCHIK u. PAGE können Kaninchen in einer Woche bis zu 2 g Cholesterin abbauen. Bei Zufuhr dieser Mengen stellt sich wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausscheidung bzw. Abbau ein, so daß eine allgemeine Organlipomatose vermieden wird, an der nach W. W. MEYER die Arterien nur „teilnehmen“. Derartige ubiquitäre Organveränderungen konnten bei unseren Versuchstieren nicht beobachtet werden.

Technik. Junge Kaninchen erhielten wöchentlich 2mal 1,0 g Cholesterin mittels Schlundsonde, daneben täglich 0,25 mg/kg Ephedrin¹ i.m. für die Dauer von 10 Monaten und anschließend 30, 35 und 40 γ /kg Adrenalin i.v. 10 Wochen lang. Nach Ablauf eines Jahres erfolgte die Sektion. Das zur histologischen Untersuchung bestimmte Material wurde in Formol 1:9 für 24 Std, dann in 1:4 für weitere 24 Std eingelegt. Einbettung über Alkohol-Celloidin in Paraffin. Färbungen: Hämatoxylin-Erythrosin, Toluidinblau, Trichrommethode nach MASSON in der Modifikation von LADEWIG, Darstellung der elastischen Fasern mit Orcein, Darstellung der Mucopolysaccharide mit der Fe-Komplexfärbung nach RINEHART u. ABUL HAJ sowie mit der Methode nach HOTCHKISS. Außerdem wurde der Ausfall der Metachromasie nach 3stündiger Einwirkung von Hyaluronidase (Kinetin SCHE-RING, 0,5 Schering-Einheiten/ml) bei 37,5° C und pH 5,24 untersucht.

Makroskopisch wie histologisch fanden sich die bekannten typischen Veränderungen der Cholesterinatheromatose und der Medianekrose nach Adrenalin. Eine Kombination beider Veränderungen konnte nicht beobachtet werden, vielmehr zeigten sich beide Erscheinungsformen, wenn auch in nächster Nachbarschaft, deutlich nebeneinander im Arcus aortae und in der Aorta thoracica.

Die Cholesterinatherome bildeten xanthomzellreiche Herde, zwischen denen kollagene und elastische Fasern nachweisbar waren. Innerhalb dieser Neubildungen fanden sich Zeichen des Faserunterganges in Form von verklumpten, verknäuelten und aufgesplitterten elastischen Fibrillen. Die Grundsubstanz dieser Herde zeigte bei der Darstellung mit Toluidinblau eine rosarote Färbung im Sinne einer γ -Metachromasie, die nach Einwirkung von Hyaluronidase nicht mehr nachweisbar war. Diese metachromatischen Substanzen fanden sich vorwiegend dicht über der alten, noch deutlich erkennbaren Intima, während die lichtungsnahen Anteile der Atherome keinen Farbumschlag erkennen ließen. Mit den histochemischen Methoden nach RINEHART u. HOTCHKISS ließen sich nur ganz schwach positive Reaktionsorte innerhalb dieser Neubildungen nachweisen.

Die auf die Adrenalinwirkung zurückzuführenden Arterionekrosen zeigten in der Media gestreckt verlaufende elastische Lamellen mit körnigem Zerfall, die an Stellen beginnender Nekrosenbildung auseinanderwichen und große γ -metachromatische Areale einschlossen. Diese Bezirke stellten sich nach der Färbung von RINEHART ebenso wie der

¹ Ephedrin (W. Z.) enthält 0,03 Ephedrin + 0,0003 Adrenalin in 1,0 cm³.

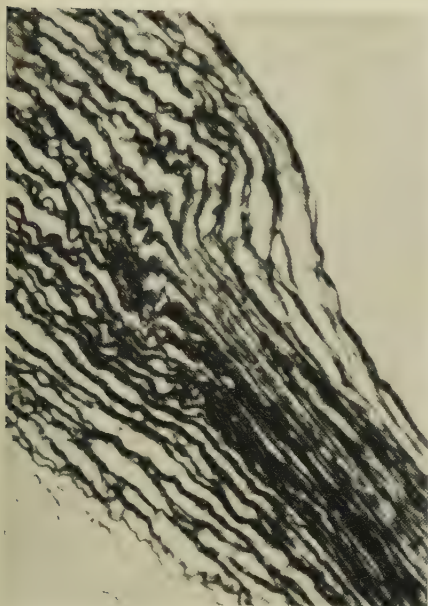
von HOTCHKISS als schwachpositive Reaktionsorte dar. Die Hyaluronidasewirkung löschte auch hier die Metachromasie vollständig.

Dagegen zeigte sich im Bereich der zerfallenden elastischen Fasern ein stark positiver Ausfall der HOTCHKISS-Reaktion, während die Färbung nach RINEHART nur unsichere und nicht distinkte Ergebnisse gab. An den Außenseiten der Lamellen fand sich bei der Färbung mit Toluidinblau eine starke γ -Metachromasie, die nach Behandlung mit Hyaluronidase nicht mehr nachweisbar war. Dagegen zeigten die zentralen Lamellenanteile wie ihre Bruchstücke eine violett-bläuliche β -Metachromasie, die auch nach Einwirkung von Hyaluronidase erhalten blieb. In Fällen größerer Nekrosenbildung mit Verkalkungen fand sich bei Darstellung mit der HOTCHKISS-Methode stark positives Material innerhalb dieser Herde, während sich bei der Fe-Komplexfärbung die Gewebsteile violett-rötlich darstellten und einen ähnlichen Farbton zeigten, wie er sich auch bei den kollagenen Fasern der Adventitia fand.

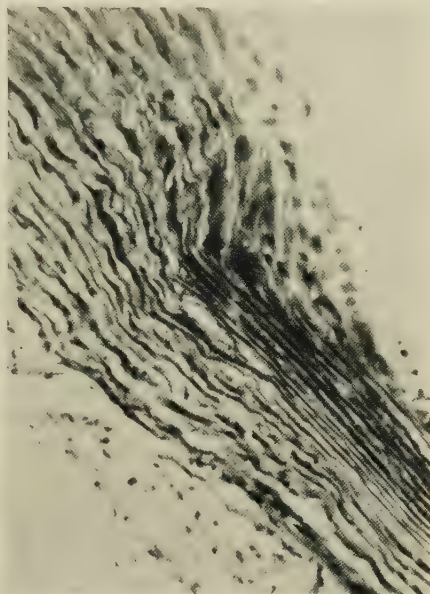
Der uneinheitliche Ausfall der beiden Darstellungsmethoden für Polysaccharide dürfte seine Erklärung in der zu umfassenden und komplexen Reaktion der RINEHART-Färbung finden, die von PEARSE als etwas unsicher und von GOMORI als kaum brauchbar zur sicheren histochemischen Identifizierung bezeichnet wird. JOEL u. HOPFS verwandten sie jedoch für die Darstellung der sauren Polysaccharide. Nach unseren Erfahrungen dürfte jedoch die HOTCHKISS-Methode zunächst zu bevorzugen sein; eine Formolfixation mit nachfolgender Paraffineinbettung ist dabei wohl zulässig, da die Zahl der positiv reagierenden Substanzen wahrscheinlich weiter eingengt wird. Nach LIPPEL bleiben bei diesem Vorgehen nur die wasser- und lipidunlöslichen Polysaccharidkomplexe im Gewebe erhalten.

Die so erhaltenen Befunde lassen erkennen, daß die morphologischen Veränderungen, die auf die Verfütterung von Cholesterin zurückzuführen sind, in ihrer Grundsubstanz eine γ -Metachromasie zeigen, jedoch lassen sich mit den Methoden nach RINEHART u. HOTCHKISS nur sehr schwach positive Reaktionsorte finden. Dieses Verhalten zusammen mit der Labilität gegenüber Hyaluronidase macht nach PEARSE wahrscheinlich, daß sich an diesen Orten Hyaluronsäure oder Chondroitinschwefelsäure bzw. Gemische saurer Mucopolysaccharide vorfinden. Die gleichartig reagierenden Strukturen der interlamellären Areale bei der beginnenden Adrenalinnekrose dürften ebenfalls den oben angeführten Substanzen zuzurechnen sein. Daneben findet sich aber in den zentralen Lamellenanteilen eine starke β -Metachromasie sowie ein stark positiver Ausfall der HOTCHKISS-Färbung. Dies Verhalten ist nach PEARSE charakteristisch für neutrale Polysaccharide bzw. deren Eiweißkomplexe.

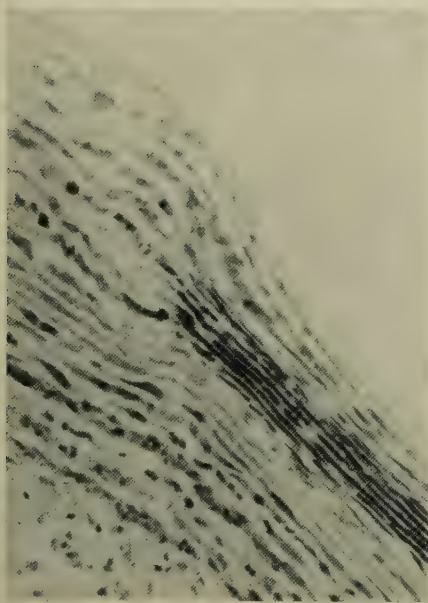
Hinsichtlich des Auftretens von Polysacchariden bestehen somit Beziehungen zwischen der Cholesterinatheromatose und der Adrenalinnekrose in ihrem Frühstadium einerseits und der Human-Arteriosklerose andererseits. Trotzdem kann aus der Anwesenheit bestimmter chemisch isolierter Komplexe in Geweben nicht ohne weiteres geschlossen



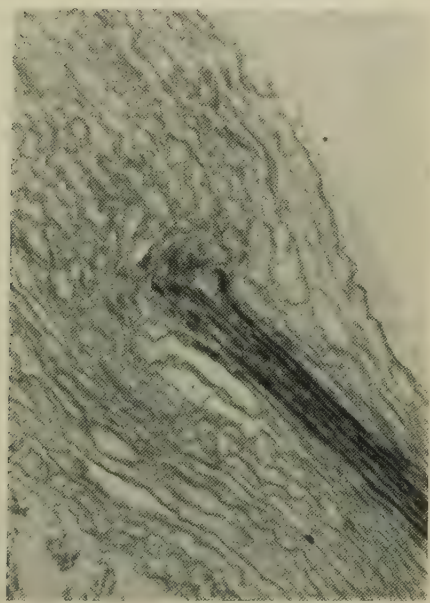
a



b



c



d

Abb. 1. Beginnende Adrenalinnekrose. *a* Färbung mit Orcein; *b* Färbung mit Toluidinblau; *c* Färbung mit Toluidinblau nach Einwirkung von Hyaluronidase; *d* HORKISS-Reaktion. — (System Zeiss-Opton KPl 12,5—10/0,22.)

werden, daß es sich um Verbindungen aus pathogenetisch gleichartigen Vorgängen handelt. Die Spätformen der pathologischen Veränderungen vor allem bei der Adrenalinnekrose zeigen morphologisch deutlich die Unterschiede. Wenn also die Morphologie der experimentellen Gefäßveränderungen nur bedingt mit den Bildern der menschlichen Arteriosklerose verglichen werden kann, so muß doch betont werden, daß sich im Tierversuch die gleichen Polysaccharidkomplexe nachweisen lassen wie bei der Humanerkrankung. Diese metachromatischen Substanzen vermehren sich beim Menschen mit zunehmendem Alter und lagern lange vor der Manifestation durch histologische Methoden Calcium und Cholesterin ein, und ebenso verhält sich auch das Aortengewebe von Tieren, nur daß die Substrate morphologische Unterschiede zeigen. Der histochemische Nachweis und das Verhalten der Mucopolysaccharide im Tierversuch dürfte also als ein weiteres frühes Kriterium zur Beurteilung experimenteller Gefäßveränderungen neben der Morphologie von Bedeutung sein.

Zusammenfassung.

Mit histochemischen Methoden wurden die Gefäßveränderungen bei der kombinierten Adrenalin-Cholesterin-Sklerose des Kaninchens untersucht.

Hierbei konnten Polysaccharidkomplexe gefunden werden, die sich nach Lokalisation und histochemischem Verhalten unterscheiden und die im übrigen auch bei der humanen Arteriosklerose gefunden werden.

Literatur.

- GOFMAN, J. W., u. Mitarb.: *Circulation* (New York) **2**, 161 (1950). — GOMORI, G.: *Microscopic Histochemistry*, Chicago 1953. — HOLMGREN, H.: *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* **47**, 489 (1940). — HOTCHKISS, R. D.: *Arch. of Biochem. a. Biophysics* **16**, 131 (1948). — JOEL, W., and H. C. HOPPS: *37. Ann. Meet. Amer. Soc. Exp. Path.* New York City 1952. — KEESER, E.: *Med. Klin.* **1952**, 542; **1953**, 499. — KROETZ, CHR., u. F. W. FISCHER: *Dtsch. med. Wschr.* **1954**, 653. — LIPP, W.: *Histochemische Methoden*. München 1954. — LUTWAK-MANN, C.: *Biochemic. J.*, **35**, 610 (1941). — MENSCHIK, W., u. I. PAGE: *Zit. nach K. LANG*, *Der intermediäre Stoffwechsel*. Berlin 1953. — MEYER, W. W.: *Virchows Arch.* **316**, 268 (1949). — *Klin. Wschr.* **1952**, 244. — NORDMANN, M.: *Z. Altersforsch.* **6**, 211 (1952). — PEARSE: A. G. E.: *Histochemistry*. London 1954. — RINEHART, J. F., and S. K. ABUL HAJ: *Arch. of Path.* **52**, 189 (1951). — SYLVEN, B.: *Zit. HOMMERICH, K. W.*, *Virchows Arch.* **322**, 282 (1952). — THAUER, R.: *Nauheimer Fortbildungsvorträge*, 17. 11. 1952. — WATERMANN, N.: *Zit. LUBARSCH, O. u. F. HENKE*, *Handbuch path. Anat.* **II/1924**.

Dr. K.-F. BENITZ, Pharmakolog. Inst. Univ.-Krankenhaus Eppendorf,
Hamburg 20, Martinistraße 52.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. SCHOEN).

Der Einfluß der Ammoniumchlorid-Acidose auf Gesamtwasser, extra- und intracelluläres Flüssigkeits- volumen und extracelluläre Elektrolyte.

Von

MAX SCHWAB, ROSEMARIE KOCH, KARL-EBERHARD KOCH,
EWALD GÖLTNER und HANS RIGGERT.

(Eingegangen am 12. Juli 1954.)

Die Verstärkung der Quecksilberdiurese durch Ammoniumchlorid (NH_4Cl) übersteigt die additive Wirkung dieser Pharmaka eindeutig (GOODMAN-GILMAN). Die Erklärung ihres Zustandekommens verlangt eine eingehende Kenntnis der Einzelwirkung jedes der beiden Pharmaka. Der Mechanismus der Quecksilberwirkung wurde in den letzten Jahren vielfach bearbeitet (SMITH; DUGGAN und PITTS; SCHWARTZ und WALLACE; AXELROD und PITTS; WESTON, GROSSMAN und LEITER). Über die NH_4Cl -Diurese ist weniger bekannt. Zwar haben GAMBLE, BLACKFAN und HAMILTON sowie KEITH und WHELAN klargestellt, daß alle acidotisch wirkenden Salze, besonders NH_4Cl , über eine Steigerung der Chlorid- und äquivalente Abnahme der Bicarbonatkonzentration der extracellulären Flüssigkeit eine Acidose erzeugen; es war aber nicht zu übersehen, ob die vermehrte Flüssigkeitsausscheidung auf eine primäre Mehrausscheidung von Wasser mit sekundärem Anstieg der Basenaussfuhr oder umgekehrt auf eine primäre Steigerung der Basenausscheidung mit nachfolgender Wasserdiurese zurückgeführt werden mußte. Ebenso war die Frage offen, ob die vermehrt ausgeschiedene Flüssigkeit dem extracellulären Raum allein entstammt oder ob auch eine Verminderung des intracellulären Flüssigkeitsvolumens stattfindet.

Methodik.

Die Meßwerte wurden an insgesamt 19 gesunden weiblichen Versuchspersonen (Vpn.) gewonnen. Jede von ihnen kam im Abstand von 3 Tagen 2mal zur Untersuchung. 8 Vpn. dienten als Kontrollgruppe; sie erhielten in der Zeit zwischen den Untersuchungen kein Medikament. 11 Vpn. bekamen im Anschluß an die erste Untersuchung 30 g NH_4Cl in der Form, daß an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 g gegeben wurden. Dies entspricht einer Zufuhr von insgesamt 561 mval Chlorid. Wesentliche Unverträglichkeitserscheinungen traten nicht auf, wenn NH_4Cl in Trockenverschlußkapseln zu je 1 g im Anschluß an die Mahlzeiten eingenommen wurde.

I. Bestimmung des Gesamtwassers, des extra- und intracellulären Flüssigkeitsvolumens.

1. Das *Gesamtwasser* wurde als *Antipyrin-Verteilungsvolumen* bestimmt. Die Vpn. erhielten 50 ml einer 3%igen wäßrigen Antipyrinlösung innerhalb von 5 min i.v. injiziert. Bei langsamer Injektion traten mit Ausnahme von geringem, schnell vorübergehendem Schwindelgefühl und bei 2 Vpn. beobachtetem Niesen keine Nebenwirkungen auf. Die für die Berechnung des Antipyrin-Verteilungsvolumens nötige Plasmakonzentration muß wegen des Abbaus von Antipyrin im Stoffwechsel durch Aufnahme einer Konzentrations-Zeitkurve gewonnen werden. Es wurden daher nach 3, 4, 5, 6 und 7 Std aus einer Verweilkanüle in der Vena cubitalis Blutproben zur Antipyrinbestimmung entnommen und mit 2 Tropfen Liquemin ungerinnbar gemacht. Die aus den einzelnen Blutproben gewonnenen Antipyrinkonzentrationen wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Extrapolation auf die Zeit Null ergab die Anfangsplasmakonzentration. Diese wurde zur Korrektur auf Plasmawasser durch 0,93 dividiert. Das Antipyrin-Verteilungsvolumen berechnet sich demnach wie folgt:

$$\frac{\text{Injizierte Antipyrinmenge (mg)} \cdot 0,93 \cdot (\text{Liter})}{\text{Plasmakonzentration (mg)}}$$

Die *chemische Bestimmung des Antipyrins* wurde nach BRODIE u. Mitarb. vorgenommen. Folgende Abänderungen der Methodik erwiesen sich als nötig bzw. zweckmäßig. Die durch Diazotierung entstehende Antipyrinverbindung besitzt ihr Absorptionsmaximum bei 350 m μ . Eine mit dem JUNICAM-Spektrophotometer aufgenommene „typische Farbkurve“ ergab, daß auch bei 366 m μ noch ausreichende Absorption vorhanden ist. Die Messungen ließen sich daher bequem mit dem Photometer Eppendorf der Netheler & Hinz GmbH. (früher Elektromedizinische Werkstätten Hamburg) bei Benutzung der Quecksilberlinie 366 m μ durchführen. Im Unterschied zu den amerikanischen Autoren geschah die endgültige Ablesung der Extinktion erst nach 1 Std, da bis dahin eine Extinktionszunahme beobachtet wurde. Als Leerwerte dienten Plasmaproben, welche vor Antipyrininjektion entnommen und genauso behandelt wurden wie die antipyrinhaltigen. Die Eichkurven wurden mit wäßrigen Antipyrinlösungen aufgestellt. Da das LAMBERT-BEERSche Gesetz erfüllt war, ließen sich die Plasmakonzentrationen aus den Extinktionen durch Multiplikation mit Eichfaktor errechnen.

2. Das *extracelluläre Flüssigkeitsvolumen* (e. F.) wurde als *Inulin-Verteilungsvolumen* bestimmt. Es wurde im wesentlichen so vorgegangen wie früher beschrieben (KOCH u. SCHWAB). Folgende Abänderungen erschienen zweckmäßig. Das Plasmafiltrat wurde mit Aqua bidest. 1:2 verdünnt, da bei den hohen Plasmakonzentrationen (bis 30 mg%) in seltenen Fällen Abweichungen vom LAMBERT-BEERSchen Gesetz zu beobachten sind. Stets wurde ein Eichwert (20 mg%) mitgeführt, da die Steigung der Eichkurven trotz peinlicher Einhaltung aller bekannten einflussnehmenden Faktoren häufiger nicht unwesentliche Unterschiede zeigte. Auch durch die Verlängerung der für den Ablauf der SELIWANOFF-Reaktion erforderlichen Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 1 Std (KRUGHÖFFER) konnte keine Konstanz der Eichkurven erzielt werden. Deshalb wurde die Kochdauer bei 10 min belassen (DEUTSCH). Unterschiede in der Steilheit der Eichkurven können sich deshalb deutlich auswirken, weil Blut- und zugehörige Urinproben wegen der 20stündigen Harnsammelzeit an verschiedenen Tagen zur Bestimmung kommen. Diese Schwierigkeiten der Inulinbestimmung spielen bei der renalen Clearanceuntersuchung deshalb keine Rolle, weil Plasma- und Urinproben im gleichen Ansatz verarbeitet werden können. Der Urinleerwert wurde aus einer 30–50 min dauernden Leerperiode vor Inulinzufuhr und Umrechnung auf die Harnsammelzeit gewonnen.

Auch diesmal lagen die Plasmainulinkonzentrationen in den 5 Std.-Proben fast durchweg höher als in den 6 Std.-Proben. Der Quotient 5/6 Std.-Wert betrug im Mittel aller Bestimmungen 1,072. Daraus geht also hervor, daß nach 5stündiger Dauerinfusion noch keine gleichmäßige Erfüllung des extracellulären Raumes mit Inulin erreicht ist. Man kann annehmen, daß auch im Anschluß an die 6stündige Dauerinfusion ein weiterer Abfall der Plasmainulinkonzentration stattfindet. Dieser mangelhafte Ausgleich zwischen Plasma- und interstitieller Inulinkonzentration wird neuerdings mit der nur sehr langsam erfolgenden Diffusion in das an Kollagen und Elastin des Bindegewebes gebundene Wasser erklärt (NICHOLS u. Mitarb.).

3. Das *intracelluläre Flüssigkeitsvolumen* (i. F.) errechnete sich durch Subtraktion des Inulin- vom Antipyrin-Verteilungsvolumen. Auf die nähere Definition der so gemessenen Flüssigkeitsphasen wird weiter unten eingegangen werden.

II. Bestimmung der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid und Bicarbonat.

Natrium und Kalium wurden flammenphotometrisch, Chlorid mercurimetrisch in der früher angegebenen Weise (DÖRRIE, GÖLTNER u. SCHWAB) bestimmt. Bezüglich der *Bicarbonatbestimmung* wird auf die Ausführungen unter Säure-Basen-Gleichgewicht verwiesen.

Die *Berechnung* der im Inulin-Verteilungsvolumen (I_V) vorhandenen Gesamtmenge (I_E) der einzelnen Elektrolyte wurde in folgender Weise durchgeführt. I_E setzt sich aus der im Plasma (P_E) und im interstitiellen Raum ($I_E - P_E$) vorhandenen Menge zusammen: $I_E = P_E + (I_E - P_E)$. P_E ist als Produkt von Plasmavolumen (P_V) und Plasmakonzentration (P_C) gegeben. $I_E - P_E$ ergibt sich aus dem Volumen der interstitiellen Flüssigkeit ($I_V - P_V$) multipliziert mit der durch Donnan (k)- und Plasmawasser (w)-Faktor korrigierten Plasmakonzentration ($P_C \cdot k/w$). Man erhält demnach die Beziehung

$$I_E = (P_V \cdot P_C) + (I_V - P_V) \cdot (P_C \cdot \frac{k}{w}); \quad (1)$$

durch Umformung erhält man

$$I_E = P_C \cdot (P_V + \frac{k}{w} [I_V - P_V]). \quad (2)$$

Als w wurde 0,93, als k für Natrium 0,95, für Kalium 0,90, für Chlorid und Bicarbonat 1,02 (SMITH) eingesetzt. Da für Natrium und Kalium der Quotient k/w nur unwesentlich von 1 abweicht, erschien es berechtigt, die Gesamtmenge des im Inulin-Verteilungsvolumen vorhandenen Natriums und Kaliums allein durch Multiplikation von P_C mit I_V zu ermitteln. Bei Chlorid und Bicarbonat wurde nach Formel (2) verfahren, wobei als P_V 4,5% des Körpergewichts eingesetzt wurden; die durch die NH_4Cl -Acidose bewirkte P_V -Änderung wurde nicht berücksichtigt.

III. Bestimmung des Säure-Basen-Gleichgewichts.

1. Die *Bestimmung des CO_2 -Drucks im arteriellen Plasma* erfolgte durch die Messung des alveolaren CO_2 -Drucks unter Annahme der Identität beider Werte. Bei den meisten Vpn. wurde er zusätzlich aus dem direkt gemessenen pH -Wert und dem CO_2 -Gehalt des Plasmas mittels der HENDERSON-HASSELBALCHSchen Gleichung bzw. des darauf basierenden Nomogramms von SINGER u. HASTINGS ermittelt. Die Entnahme der Alveolarluftproben geschah mit evakuierten Büretten in der Weise, daß die Vpn. während des ersten Teils der Ausatmung, also nicht erst am Ende der Ausatmung, zu starker und schneller Expiration aufgefordert wurden. Bei den meisten Vpn. wurden 2 Büretten im Abstand von 10–15 min gefüllt, in einigen Fällen nur eine. Die Gasanalysen erfolgten mit dem HALDANESchen Apparat.

2. Der CO_2 -Gehalt des arteriellen Plasmas wurde aus dem des arteriellen Blutes mit Hilfe des Nomogramms von PETERS u. VAN SLYKE berechnet. Hierfür ist neben

dem CO_2 -Druck bzw. dem Plasma- pH die Kenntnis der O_2 -Kapazität und der arteriellen Sättigung erforderlich.

Für die Bestimmung der O_2 -Kapazität wurden wenige Milliliter Blut in einem 50 ml-ERLENMEYER-Kolben (kleine Benetzungsflächen!) etwa 10 min geschüttelt und so mit der Zimmerluft in Ausgleich gebracht. Um den an Hämoglobin (Hb) gebundenen O_2 zu erhalten, ist der physikalisch gelöste unter Berücksichtigung des Wasserdampfdruckes bei der vorliegenden Zimmertemperatur aus O_2 -Druck und Löslichkeitskoeffizienten (α) zu berechnen und vom O_2 -Gehalt der Blutprobe abzuziehen. Folgende α -Werte wurden benutzt (OPITZ u. BARTELS).

Tabelle 1.

	20°	21°	22°	23°	24°
α_{O_2} , Vollblut	0,0344	0,0337	0,0329	0,0321	0,0312

Der abzuziehende physikalisch gelöste O_2 betrug bei 20° und mittlerem Barometerdruck (747 mm Hg) 0,692, bei 21° 0,676, bei 22° 0,660, bei 23° 0,643 und bei 24° Zimmertemperatur 0,622 Vol. % O_2 .

Die prozentuale arterielle Sättigung (S) ergibt sich in folgender Weise:
 $S = 100 \cdot \text{O}_2\text{Hb}/\text{Hb} + \text{O}_2\text{Hb}$. Um im Zähler dieses Bruches aus dem arteriellen O_2 -Gehalt auf den an Hb gebundenen O_2 zu kommen, wurde der physikalisch gelöste O_2 aus dem arteriellen O_2 -Druck und dem Löslichkeitskoeffizienten bei 37° bestimmt und abgezogen. α beträgt für 37° und Vollblut 0,0214 + (0,000108 · Vol. % O_2Hb -Kapazität). Der arterielle O_2 -Druck (P_{aO_2}) wurde aus dem effektiven alveolaren O_2 -Druck ($P^{\text{a}}\text{O}_2$) unter Annahme einer alveolar-arteriellen O_2 -Druckdifferenz von 9 mm Hg gewonnen. $P^{\text{a}}\text{O}_2$ ergab sich aus dem O_2 -Druck der Einatemungsluft (P_{IO_2}), dem O_2 -Anteil der Einatemungsluft (F_{IO_2}) und dem respiratorischen Quotienten (R) mittels der Beziehung von RILEY:

$$P^{\text{a}}\text{O}_2 = P_{\text{IO}_2} + \frac{P_{\text{ACO}_2} \cdot F_{\text{IO}_2} (1-R)}{R} - P_{\text{ACO}_2}/R. \quad (1)$$

Folgende Umformung ist für das Zahlenrechnen vorzuziehen:

$$P^{\text{a}}\text{O}_2 = P_{\text{IO}_2} - P_{\text{ACO}_2} \cdot \frac{1 - F_{\text{IO}_2} (1-R)}{R}. \quad (2)$$

Für R wurde 0,85 eingesetzt.

Als Mittelwert für den physikalisch gelösten O_2 fand sich bei den Acidose-Vpn. vor NH_4Cl -Gabe $0,292 \pm 0,0027$ (mittlerer Fehler) Vol. %, nach NH_4Cl $0,318 \pm 0,0038$ Vol. %. S betrug vor Acidose $97,17 \pm 1,591\%$, nach Acidose $97,4 \pm 1,016\%$. Bei einem $P = 0,9$ liegt dieser Unterschied im Zufallsbereich. Diese hier gefundenen Werte für S liegen um etwa 1,5–2% höher als gewöhnlich angegeben wird, stimmen aber sehr gut mit denen von COMROE u. WALKER, ROUGHON, DARLING u. ROOT sowie WOOD u. CRONIN überein. Als Erklärung ist anzuführen, daß bei der hier durchgeführten Kapazitätsbestimmung ein höherer Wert für den physikalisch gelösten O_2 abgezogen wurde, als z. B. bei PETERS u. VAN SLYKE mit 0,5 Vol. % angegeben ist.

Das gegenüber voller Sättigung bestehende sehr geringe Defizit wurde für die Berechnung des Plasma- CO_2 -Gehaltes aus dem des Blutes vernachlässigt.

Die Blutgasanalysen wurden mit dem manometrischen Apparat streng nach den Vorschriften von PETERS u. VAN SLYKE in 1 ml-Blutproben durchgeführt.

3. Das pH im arteriellen Plasma ergab sich aus dem CO_2 -Druck und dem CO_2 -Gehalt des Plasmas mit Hilfe des Nomogramms von SINGER u. HASTINGS. Außerdem wurde bei der Mehrzahl der Vpn. eine direkte pH -Messung mit der Glaselektrode

bei 37° im Luftthermostaten vorgenommen. Als p_H -Meßgerät kam das PHM 3 der Firma Radiometer, Kopenhagen zur Verwendung. Die bei 37° deutlich in Erscheinung tretende Blutglykolyse mit Zunahme der $[H^+]$ wurde durch Aufstellung von p_H -Zeitkurven und Extrapolation auf die Zeit Null ausgeschaltet. Die Eichung des p_H -Meßgerätes erfolgte mit Phosphatpuffern von $p_H = 7,43$ und $p_H = 7,38$. Ihr p_H -Wert bei 37° wurde durch Abzug von 0,029 p_H ermittelt (HASTINGS u. SENDROY). Bezüglich der methodischen Einzelheiten und des Vergleichs der über die direkte p_H -Messung und über die Bestimmung der alveolaren CO_2 -Drucke gewonnenen Plasma- CO_2 -Drucke wird auf eine in Vorbereitung befindliche Arbeit von P. DOERING verwiesen. Da nicht in allen Fällen die direkte p_H -Messung durchgeführt wurde, sind in Tab. 3 mit Ausnahme der Vpn. F. Sch. (vor Acidose) und W. B., I. O. und E. H. (nach Acidose) die gasometrisch gewonnenen p_H -Werte aufgeführt; bei den genannten Vpn. wurden die direkt gemessenen p_H -Werte eingesetzt.

4. Die *Bicarbonatkonzentration* wurde aus dem CO_2 -Gehalt und dem CO_2 -Druck des arteriellen Plasmas mit Hilfe des Nomogramms von SINGER u. HASTINGS gewonnen.

Die *Alkaliereserve im Plasma* (Gesamt- CO_2 — physikalisch gelöster CO_2 bei 40 mm CO_2 -Druck und voller arterieller Sättigung) ergab sich aus dem CO_2 -Gehalt des arteriellen Blutes, dem CO_2 -Druck und dem Hb-Gehalt unter Benutzung des Nomogramms bei HENDERSON („Blut“, S. 270; Leipzig und Dresden 1932). Die Einzelheiten des Vorgehens sind bei DÖRING u. LOESCHCKE geschildert. Das gegenüber voller arterieller Sättigung bestehende unwesentliche Defizit wurde vernachlässigt.

Die *Pufferbasen im arteriellen Plasma* (Basen, die der Summe der Pufferanionen [Bicarbonat, Phosphat und Proteinanionen] äquivalent sind) wurden aus dem CO_2 -Gehalt und dem CO_2 -Druck mit Hilfe des Nomogramms von SINGER u. HASTINGS gewonnen. Subtrahiert man von der Pufferbasen- die Bicarbonatkonzentration, so erhält man also die Phosphat- + Proteinanionen-Konzentration.

Entnahme und Aufbewahrung der arteriellen Blutproben geschahen in folgender Weise. Bei guter Lokalanästhesie gelang es fast ausnahmslos, die Femoralarterie schmerzfrei zu punktieren und damit eine Hyperventilation zu vermeiden. Das arterielle Blut wurde in 10 ml-Rekordspritzen aufgezogen, deren Ansätze mit Liquemin luftfrei gefüllt waren. Der Spritzenansatz wurde nach beendeter Punktion sofort mit einer liquemingefüllten Injektionskanüle mit Gummistopfen verschlossen. Um eine gute Durchmischung des Blutes vor der Einbringung in den manometrischen Apparat zu erzielen, wurde nach kräftigem Schütteln etwas Blut ausgespritzt und 1 Tropfen Quecksilber aufgezogen. Nach erneutem kräftigen Schütteln erfolgte Einfüllung in die OSTWALD-Pipette. Zwischen der Blutentnahme und der Analyse lagen die Spritzen auf Eis. Bei dieser für gute Analysenergebnisse ausschlaggebenden Behandlung und Aufbewahrung der Blutproben ließen sich in der überwiegenden Mehrzahl der Analysen Doppelbestimmungen erzielen, wie sie bei PETERS u. VAN SLYKE angegeben werden (Unterschied zwischen den Doppelbestimmungen < 0,05 Vol.%).

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem FISHERSchen t-Test.

V Versuchsergebnisse.

1. *Säure-Basen-Gleichgewicht.* Die Veränderungen des Säure-Basen-Gleichgewichts sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Der CO_2 -Druck sank von $37,14 \pm 0,683$ mmHg auf $31,00 \pm 0,912$ mmHg ab. Der Ausgangswert von 37,14 mm Hg mag zunächst etwas niedrig erscheinen, wenn man ihn mit den normalerweise angegebenen Mittelwerten von 38—42 mm Hg

praemenstruelle Erniedrigung des CO_2 -Druckes ausgezeichnet sind (HEERHABER; DÖRING; LOESCHKE; GOODLAND und POMMERENKE).

Der CO_2 -Gehalt im arteriellen Plasma betrug vor Acidose im Mittel $24,11 \pm 0,407$ mmol/l und liegt damit an der unteren Grenze des von

Tabelle 3.

Autoren	Methode	Zahl d. Vpn.	alveolarer CO_2 -Druck (mm Hg)	Bemerkungen
FITZGERALD u. HALDANE (1905)	endexpir. } Mittel- endinspir. } wert	32	36,3	
LOESCHKE u. SOMMER (1944)	end-normal- expir.	5 7	36,9 35,7	sitzend 2 sitzend, 5 liegend
	(automatisch nach BENZINGER-BRAUCH)	5	37,04	
JULICH (1951)	endexpir.	21	36,8	

SINGER und HASTINGS angegebenen Normalbereichs (niedriger Hb-Gehalt!). Das Plasma-pH nahm von $7,405 \pm 0,005$ auf $7,354 \pm 0,007$ ab. Die Bicarbonatkonzentration betrug vor Acidose $22,84 \pm 0,371$, nachher $16,96 \pm 0,585$ mval/l. Die Alkalireserve liegt definitionsgemäß etwas höher: $23,43 \pm 0,296$ vor und $18,60 \pm 0,441$ mval/l nach Acidose. Die Pufferbasen nahmen von $40,60 \pm 0,376$ auf $34,25 \pm 0,623$ mval/l ab.

2. Gesamtwasser, extra- und intracelluläres Flüssigkeitsvolumen. Eine Übersicht über die einzelnen Flüssigkeitsphasen und ihre Veränderungen zeigt Tab. 4. Das Gesamtwasser betrug bei den 11 Versuchspersonen der Acidoseversuche vor NH_4Cl -Gabe $31,43 \pm 1,540$ Liter bzw. $52,52 \pm 1,492\%$ des Körpergewichts. Nach NH_4Cl lagen die Werte mit $29,84 \pm 1,535$ Liter bzw. $50,78 \pm 1,652\%$ des Körpergewichts signifikant ($P < 0,01$) niedriger. Bei Versuchsperson H. P. wurde eine Differenz von 4,82 Liter gemessen. Der nur 0,5 kg betragende Gewichtsunterschied zeigt jedoch, daß die gefundene Verminderung des Gesamtwassers nicht stimmen kann. Da ein Meßfehler nicht ausfindig gemacht werden konnte, mußten die Meßwerte in Tab. 2 mit aufgenommen werden. Es wurden jedoch zusätzlich die Mittelwerte und mittleren Fehler ohne die Versuchsperson H. P. aufgeführt. Der Unterschied im Gesamtwasser ohne Versuchsperson H. P. beträgt im Mittel 1,25 Liter. Dieser Wert stimmt fast völlig mit dem Gewichtsunterschied von 1,1 kg überein.

Das Inulin-Verteilungsvolumen als Maß des extracellulären Flüssigkeitsvolumens ergab vor Acidose $9,66 \pm 0,572$ Liter bzw. $16,21 \pm 0,853\%$ des Körpergewichts, nachher $8,23 \pm 0,475$ Liter bzw. $14,09 \pm 0,825\%$ des Körpergewichts. Der Unterschied beträgt 1,25 Liter, ist also mit dem Gesamtwasserverlust und dem Gewichtsverlust praktisch identisch.

Tabelle 4. *Antipyrin-, Inulin- und Antipyrin—Inulin-Verteilungsvolumen bei 11 gesunden weiblichen Versuchspersonen vor und nach 30 g Ammoniumchlorid.*

Name, Alter (Jahre)	Größe	Gewicht		Antipyrin-			Inulin-			Verteilungsvolumen						Antipyrin—Inulin-					
		vor	nach	vor		nach		vor		nach		vor		nach		Liter	% Körper- gewicht	Antipyrin- verteilungs- volumen	Liter	% Körper- gewicht	Antipyrin- verteilungs- volumen
				Liter	% Körper- gewicht	Liter	% Körper- gewicht	Liter	% Körper- gewicht	Liter	% Körper- gewicht	Liter	% Körper- gewicht								
m	kg																				
H. P. 17	1,66	59,5	59,0	32,20	54,20	27,38	46,40	10,49	17,65	7,23	12,27	21,71	36,55	67,4	20,15	34,13	73,7				
W. B. 27	1,69	76,5	75,5	39,63	51,80	38,65	51,20	12,39	16,19	9,90	13,11	27,24	35,61	68,8	28,75	38,09	74,4				
M. E. 59	1,56	46,0	45,3	26,83	58,33	27,73	61,20	9,11	19,80	7,91	17,45	17,72	38,53	66,0	19,82	43,75	71,6				
E. Sch. 44	1,71	61,8	60,2	31,70	51,30	30,10	50,00	12,59	20,33	10,75	17,85	19,11	30,97	60,3	19,35	32,15	64,3				
M. F. 39	1,56	60,2	59,4	36,11	60,00	35,31	59,44	10,18	16,90	7,89	13,30	25,93	43,10	71,8	27,42	46,14	77,7				
M. B. 52	1,52	50,2	48,9	22,50	44,82	21,46	43,89	6,63	13,21	5,80	11,85	15,87	31,61	70,5	15,66	32,04	73,0				
E. K. 41	1,62	74,7	73,8	34,60	46,30	33,70	45,70	9,77	13,09	8,70	11,77	24,83	33,21	71,8	25,00	33,93	74,2				
I. B. 22	1,63	66,7	65,5	31,15	46,65	30,30	46,25	8,65	12,98	9,31	14,21	22,50	33,67	72,2	20,99	32,04	69,2				
I. O. 44	1,56	47,0	45,8	25,36	53,91	23,65	51,60	9,00	19,14	8,67	18,90	16,36	34,77	64,5	14,98	32,70	63,4				
F. Sch. 49	1,65	66,2	65,0	35,95	54,30	32,95	50,70	10,50	15,88	8,74	13,44	25,45	38,42	70,8	24,21	37,26	73,5				
E. H. 22	1,68	53,0	51,8	29,75	56,10	27,05	52,20	6,95	13,10	5,63	10,84	22,80	43,00	76,6	21,42	41,36	79,2				
Mittel- werte mittlere Fehler ±		60,2	59,1	31,43	52,52	29,84	50,78	9,66	16,21	8,23	14,09	21,77	36,31	69,15	21,61	36,69	72,20				
				1,540	1,492	1,535	1,652	0,572	0,853	0,475	0,825	1,203	1,245	1,334	1,325	1,529	1,487				
						P < 0,01				P < 0,01					P = 0,7						
Mittel- werte* mittlere Fehler		60,2	59,1	31,35	52,35	30,09	51,22	9,58	16,06	8,33	14,27	21,78	36,29	69,33	21,76	36,95	72,05				
				1,701	1,635	1,675	1,760	0,626	0,929	0,560	0,890	1,330	1,376	1,465	1,456	1,667	1,636				
						P < 0,01				P < 0,01					P = 0,96						

* ohne Vp. H. P.

Bildet man die Differenzen zwischen dem Antipyrin- und Inulin-Verteilungsvolumen, so resultiert ein Flüssigkeitsanteil, den man mit Vorbehalt (siehe später) als *intracelluläres Flüssigkeitsvolumen* bezeichnen kann. Er beträgt vor Acidose $21,77 \pm 1,203$, nacher $21,61 \pm 1,325$ Liter, bleibt also konstant.

Bei einer Vergleichsgruppe von 8 Versuchspersonen wurden dieselben Bestimmungen im Abstand von 3 Tagen ohne NH_4Cl -Gabe durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 5 aufgeführt. Die statistische Auswertung zeigt, daß zwischen 1. und 2. Bestimmung keine signifikanten Unterschiede bestehen.

3. *Elektrolyte.* In Tab. 6 sind die Plasmakonzentrationen und die im Inulin-Verteilungsvolumen befindlichen Gesamtmengen der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid und Bicarbonat aufgeführt. Die Natriumkonzentration ($[\text{Na}^+]$) nahm von $144,34 \pm 1,847$ um $5,54$ auf $138,8 \pm 2,013$ mval/l ab. Der Unterschied ist bei $P < 0,01$ signifikant. Auch die Gesamtmenge Natrium sank im Mittel um $251,4$ von $1393,2 \pm 81,0$ auf $1141,8 \pm 66,5$ mval ab ($P < 0,001$). $[\text{K}^+]$ zeigte keine signifikanten Unterschiede. Dagegen nahm die Kaliummenge im Inulin-Verteilungsvolumen von $38,81 \pm 2,375$ auf $31,96 \pm 1,744$ mval ab. Diese Abnahme läßt sich zwanglos durch die Verminderung des e. F. erklären. $[\text{Cl}^-]$ stieg auf Kosten der Bicarbonatkonzentration von $107,2 \pm 0,934$ auf $112,13 \pm 1,133$ mval/l hochsignifikant ($P \ll 0,001$) an, die Chloridmenge nahm jedoch von $1111,3 \pm 71,4$ um $121,0$ auf $990,3 \pm 61,8$ mval ab. Die $[\text{HCO}_3^-]$ -Abnahme von $22,81 \pm 0,379$ auf $16,96 \pm 0,584$ ist der Chlorid-

Tabelle 5. Antipyrin-, Inulin- und Antipyrin-Inulin-Verteilungsvolumen bei 8 weiblichen Versuchspersonen ohne Einfluß von Ammoniumchlorid.

Die Zahlenangaben sind Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte.

	Antipyrin-			Inulin-			Antipyrin—Inulin-		
	Gewicht	Verteilungsvolumen			Verteilungsvolumen				
		Liter	% Körpergewicht	Liter	% Körpergewicht	Liter	% Körpergewicht	% Antipyrin-Verteilungsvolumen	
1. Bestimmung	55,2	29,29 ± 2,048	53,40 ± 1,936	10,00 ± 0,780	18,33 ± 1,074	19,29 ± 1,525	35,07 ± 1,579	65,66 ± 1,560	
2. Bestimmung	55,5	29,09 ± 1,997	52,59 ± 1,760	9,91 ± 0,794	17,93 ± 0,787	19,18 ± 1,463	34,66 ± 1,635	65,79 ± 1,522	
		P = 0,06		P = 0,74		P = 0,73			

Tabelle 6. Plasmakonzentrationen (mval/l) und Gesamtmengen im Inulin-Verteilungs-
11 gesunden weiblichen Versuchspersonen

Name	Natrium				Kalium			
	vor		nach		vor		nach	
	mval/l	mval	mval/l	mval	mval/l	mval	mval/l	mval
H. P.	148,7	1557	145,2	1050	4,1	43,0	3,8	27,6
W. B.	144,8	1793	142,9	1413	3,2	39,3	3,0	29,9
M. E.	137,4	1252	127,8	1010	3,6	32,3	3,9	31,2
E. Sch.	135,2	1711	130,0	1398	4,0	50,5	4,1	44,5
M. F.	148,7	1513	139,1	1098	4,6	46,3	4,1	32,3
M. B.	144,8	959	143,4	833	4,8	32,1	4,6	26,8
E. K.	137,8	1345	137,0	1190	3,9	38,1	4,0	34,8
I. B.	152,5	1319	146,1	1360	4,0	34,2	3,9	36,0
I. O.	152,1	1369	147,0	1275	3,9	35,1	3,7	32,2
F. Sch.	146,6	1540	135,7	1184	4,8	50,0	3,9	34,2
E. H.	139,2	967	133,0	749	3,8	26,1	3,9	22,1
Mittel- werte	144,34	1393,2	138,8	1144,8	4,06	38,81	3,9	31,96
mittlere Fehler $\pm$	1,847	81,0	2,013 P < 0,01	66,5 P < 0,001	0,15	2,375	0,115 P = 0,13	1,744 P < 0,01

zunahme äquivalent. Dies zeigen am besten die Summen von $[\text{Cl}^-]$ und $[\text{HCO}_3^-]$; sie betragen vor Acidose 129,78, nach Acidose 129,57 mval/l. Da in den vorliegenden Versuchen auch die Pufferbasen, also die der Summe von $[\text{HCO}_3^-]$, $[\text{PO}_4^-]$ und [Proteinanionen] äquivalenten Basen bestimmt wurden, läßt sich durch Subtraktion von $[\text{HCO}_3^-]$ leicht die Summe von $[\text{PO}_4^-]$ und [Proteinanionen] berechnen. Diese betrug vor Acidose 17,76, nachher 17,31 mval/l. Der geringe Unterschied von 0,45 mval/l ist dabei statistisch signifikant ($P < 0,01$). In dieser Abnahme kommt entsprechend den Konstruktionsgrundlagen des verwendeten Nomogramms von SINGER und HASTINGS die Verminderung der Proteindissoziation infolge der zunehmenden $[\text{H}^+]$ zum Ausdruck. Außerdem muß auch mit einem Abfall der Phosphatkonzentration gerechnet werden, fanden doch SARTORIUS, ROEMMELT und PITTS bei der einen der 2 von ihnen untersuchten Versuchspersonen einen Phosphatabfall von 0,5 mval/l. Stellt man die Summe der Kationen der Summe der Anionen gegenüber, so finden sich die Werte der nachfolgenden Tab. 7:

Tabelle 7.

	mval/l	
	Kationen	Anionen
Vor Acidose	148,41	147,24
Nach Acidose	142,71	146,40

volumen (mval) der Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid und Bicarbonat bei vor und nach 30 g Ammoniumchlorid.

Chlorid				Bicarbonat			
vor		nach		vor		nach	
mval/l	mval	mval/l	mval	mval/l	mval	mval/l	mval
110,6	1247	115,4	913	23,3	262,5	19,8	156,0
108,6	1441	115,4	1219	22,0	292,0	17,2	181,5
109,6	1072	113,5	964	24,4	239,5	18,2	154,1
108,6	1471	112,7	1301	23,2	314,5	17,9	206,0
107,5	1174	112,5	945	21,9	238,5	15,5	130,2
104,8	741	113,5	700	23,0	162,5	14,2	87,3
109,6	1128	109,6	1011	—	—	14,8	136,8
108,6	1000	115,0	1144	22,3	205,5	17,5	174,1
106,7	1031	111,5	1040	21,5	208,0	15,5	144,7
104,8	1179	112,5	1050	21,5	242,0	16,0	149,2
99,9	740	101,9	606	25,0	185,2	20,0	119,2
107,2	1111,3	112,13	990,3	22,81	235,0	16,96	149,0
0,934	71,4	1,133 $P \leq 0,001$	61,8 $P = 0,01$	0,379	14,81	0,584 $P \leq 0,001$	9,64 $P = 0,01$

Die statistische Auswertung zeigt zwar, daß der Anionenüberschuß nach Acidose nicht signifikant ist ($P = 0,1$). Immerhin fanden aber auch SARTORIUS, ROEMMELT und PITTS bei ihren Versuchspersonen einen Überschuß der Anionen nach Acidose. Es ist demnach mit der Existenz eines echten Unterschieds zu rechnen. Da Elektroneutralität mit Sicherheit angenommen werden muß, kann es sich nur um einen scheinbaren Anionenüberschuß handeln. Es fragt sich, ob dieser etwa durch die nicht bestimmten Anionen und Kationen entstehen kann. Von den Kationen wurden Calcium und Magnesium nicht bestimmt. Normalerweise werden dafür 5 bzw. 3 mval/l angegeben (GAMBLE). Wesentliche Veränderungen durch die NH_4Cl -Acidose sind hier unwahrscheinlich. Von den Anionen wurden Sulfat und organische Säuren nicht bestimmt, für die GAMBLE normalerweise 1,0 bzw. 6,0 mval/l einsetzt. SARTORIUS, ROEMMELT und PITTS fanden bei der einen daraufhin untersuchten Versuchsperson nach NH_4Cl einen Abfall des Plasmasulfates von 1,1 auf 0,8 mval/l, jedoch keine vermehrte Ausscheidung von organischen Säuren im Harn. Danach würde also voraussichtlich auch die Berücksichtigung der nicht bestimmten Kationen und Anionen den hier gefundenen scheinbaren Anionenüberschuß nicht beseitigen. Als Erklärung hat man wahrscheinlich eine Verminderung der Dissoziation der Eiweißkörper mit einer Verminderung ihrer basenbindenden Fähigkeit anzunehmen. In ähnlicher Weise erklärt BROCH den von ihm bei verschiedenartigen Krankheiten,

vor allem bei Leberkrankheiten und Herzinsuffizienz, gefundenen scheinbaren Anionenüberschuß.

Bei einer *Vergleichsgruppe* von 8 Versuchspersonen wurden Natrium, Kalium und Chlorid im Abstand von drei Tagen ohne NH_4Cl -Gabe bestimmt. Die Plasmakonzentrationen und die im Inulin-Verteilungsvolumen befindlichen Gesamtmengen der genannten Elektrolyte sind in Tab. 8 aufgeführt. Die Meßwerte stimmen praktisch miteinander überein. Von einer statistischen Auswertung wurde daher abgesehen.

Tabelle 8.

	Natrium		Kalium		Chlorid	
	mval/l	mval	mval/l	mval	mval/l	mval
1. Bestimmung	143,8	1436,6	4,04	40,43	106,1	1139
	$\pm 1,09$	$\pm 107,4$	$\pm 0,05$	$\pm 3,16$	$\pm 1,51$	$\pm 87,14$
2. Bestimmung	143,8	1422,6	4,05	40,16	106,0	1141
	$\pm 1,28$	$\pm 109,9$	$\pm 0,05$	$\pm 3,44$	$\pm 1,51$	$\pm 92,71$

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Zur Beurteilung der gewonnenen Meßwerte ist die Besprechung derjenigen Methoden erforderlich, die für die *Messung der Flüssigkeitsräume* zur Verfügung stehen. Das *Gesamtwasser* wurde als *Antipyrin-Verteilungsvolumen* bestimmt. Nach den an Tier und Mensch erzielten Ergebnissen ist anzunehmen, daß das so bestimmte Volumen mit dem gesamten im Organismus vorhandenen Wasser praktisch identisch ist. Dafür sprechen einmal die Vergleiche mit der direkten durch Exsikkation gewonnenen Messung des Gesamtwassers (SOBERMAN); aber auch die mit Deuterium (SCHLOERB, FRIIS-HANSEN, EDELMAN u. Mitarb.) und Tritium (PRENTICE, SIRI, BERLIN u. Mitarb.) gefundenen Gesamtwasserwerte liegen nur wenig über den Antipyrin-Verteilungsvolumina. Es ist dies auf den, allerdings geringen Austausch der Deuterium- und Tritiumatome mit den H-Atomen der organischen Verbindungen zurückzuführen. Dadurch wird das Gesamtwasser mit Deuterium um 1–2%, mit Tritium um 2–4% zu hoch bestimmt. Eine Zusammenstellung der bisher mit den einzelnen Methoden veröffentlichten Ergebnisse bringt Tab. 9.

Ungünstiger liegen die Verhältnisse bei der *Bestimmung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens*. Während man zunächst auf Grund der Arbeiten von GAUDINO u. LEVITT sowie SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL Inulin als ideale Substanz zur Messung des e. F. ansehen mußte, sind inzwischen Beobachtungen gemacht worden, welche die Identität des Inulin-Verteilungsvolumens mit dem e. F. ablehnen lassen (FINKENSTÄDT, O'MEARA u. MERRILL; LAST u. Mitarb.). COTLOVE und NICHOLS mit Mitarb. haben gezeigt, daß Inulin nur sehr langsam in das an Kollagen und Elastin gebundene Wasser des Bindegewebes eindringt. NICHOLS u. Mitarb. unterscheiden daher einen Anteil des e. F., der in schnellem Austausch mit dem Plasma steht und mit Inulin in der üblichen Versuchszeit gemessen werden kann, und einen anderen, der nur langsam mit dem Plasma in Ausgleich kommt. Für die hier vorliegende Fragestellung waren diese Nachteile der Inulinmethode allerdings insofern ohne grundsätzliche Bedeutung, als es auf die Messung von Unterschieden vor und nach Acidose ankam. Diese können aber mit der Inulinmethode sicher richtig bestimmt werden. Immerhin wird man bei der Verwendung der

Tabelle 9. Übersicht über die von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden gewonnenen Werte für Gesamtwasser, extra- und intracelluläres Flüssigkeitsvolumen. Die Zahlenangaben sind Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte.

Autoren	Methode	Anzahl	Gesamtwasser % Körpergewicht	Extracelluläres		Intracelluläres	
				% Körpergewicht	Flüssigkeitsvolumen	% Körpergewicht	% des Gesamtwassers
BERGER, DUNNING, STEELE u. Mitarb.	Antipyrin-Bromid	51 ♂	52,7 ± 0,871				46,6 ± 0,994
		13 ♀	44,6 ± 1,378				41,7 ± 1,345
	Antipyrin-Bromid	3 ♂	60,3 ± 1,848	29,72 ± 1,964	30,58 ± 3,940		50,8 ± 5,068
		1 ♀	42,6	20,45	22,15		52,1
	Antipyrin-Inulin	3 ♂	60,3 ± 1,848	15,83 ± 1,072	44,53 ± 2,428		73,6 ± 4,153
		1 ♀	42,6	13,32	29,28		68,8
SCHLOERB, FRIS-HAN- SEN, EDELMAN u. Mit.	Deuterium	19 ♂	61,8 ± 0,866				
		11 ♀	51,9 ± 1,393				
PRENTICE, SIRI, BERLIN u. Mitarb.	Tritium	5 ♂	58,9 ± 1,651				
	Antipyrin	5 ♂	56,1 ± 1,608				
	Tritium	15 ♂	52,1 ± 0,774				
SOBERMAN, BRODIE, LEVY u. Mitarb.	Deuterium	6 ♂	55,70 ± 1,836				
		2 ♀	46,15				
	Antipyrin	6 ♂	54,32 ± 1,134				
		2 ♀	44,40				
	Antipyrin Spez. Gewicht	9* 9*	53,88 ± 1,899 54,34 ± 1,691				
DEANE, ZIFF u. SMITH	Antipyrin- Rohrzucker	6 ♂ 1 ♀	53,93 ± 2,585 48,25	17,16 ± 0,669 19,80	36,80 ± 2,325 28,50		67,93 ± 1,545 59,00
DEANE u. SMITH	Antipyrin- Rohrzucker	5 ♂	58,44 ± 3,279	19,55 ± 1,861	38,93 ± 3,072		66,44 ± 3,155
SCHWAB, R. KOCH, K.-E. KOCH u. Mitarb.	Antipyrin-Inulin	8 ♀ 1. Best.	53,40 ± 1,936	18,33 ± 1,074	35,07 ± 1,579		65,66 ± 1,560
		8 ♀ 2. Best.	52,59 ± 1,760	17,93 ± 0,787	34,66 ± 1,635		65,79 ± 1,522
		11 ♀	52,52 ± 1,492	16,21 ± 0,853	36,31 ± 1,245		69,15 ± 1,334

* Ohne Geschlechtsangabe; mit Klammern = identische Vpn.

Inulinmethode der Bezeichnung „Inulin-Verteilungsvolumen“ an Stelle von „extracellulärem Flüssigkeitsvolumen“ den Vorzug geben. Sinngemäße Einschränkungen gelten natürlich auch für die *Bestimmung des intracellulären Flüssigkeitsvolumens* als Differenz des Antipyrin- und Inulin-Verteilungsvolumens.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß nach 30 g NH_4Cl (561 mval Chlorid) eine *Verminderung des Körpergewichts im Mittel um 1,1 kg, des Gesamtwassers um 1,25 Liter und des Inulin-Verteilungsvolumens um ebenfalls 1,25 Liter* stattfindet.

Die Abnahme des Gesamtwassers stimmt also mit der des Körpergewichts sehr gut überein. Sie ist allein auf einen Verlust an extracellulärer Flüssigkeit zurückzuführen, das i. F. bleibt unverändert.

Ob diese Beschränkung des Flüssigkeitsverlustes auf die extracelluläre Phase auch unter anderen Versuchsbedingungen gilt, z. B. bei höheren und länger verabreichten NH_4Cl -Gaben (SARTORIUS, ROEMMELT u. PITTS) oder bei Einschränkung der Flüssigkeitszufuhr, kann nicht entschieden werden.

Die *Verminderung der Natriummenge* im Inulin-Verteilungsvolumen beträgt 251,4 mval. Sie erklärt sich durch die Ausscheidung natriumhaltiger extracellulärer Flüssigkeit und die Steigerung der Natriumausscheidung zur Neutralisation des vermehrt ausgeschiedenen Chlorids. Setzt man für $[\text{Na}^+]$ 140 mval/l ein, dann ergibt sich für einen Verlust von 1,43 Liter extracellulärer Flüssigkeit (Werte einschließlich Versuchsperson H. P.) eine Natriummenge von 200 mval. Der Rest von 51,4 mval ist natürlich viel zu gering, um die für die Chloridneutralisation erforderliche Natriummehrausscheidung wiedergeben zu können. Es muß also in beträchtlichem Umfang eine Freisetzung von Natrium aus den Basenreservoirs des Körpers, besonders den Knochen, stattfinden. Die *Chloridmenge* nimmt unabhängig von der durch die NH_4Cl -Zufuhr bedingten Mehrausscheidung von 561 mval um 121 mval ab. Diese Abnahme läßt sich zwanglos auf die Verminderung chloridhaltiger extracellulärer Flüssigkeit zurückführen.

Der Flüssigkeitsverlust ist im wesentlichen auf die vermehrte Harnausscheidung zurückzuführen, wenn auch eine Steigerung der extrarenalen Wasserabgabe (OEHME) eine zusätzliche Rolle spielen mag. Es erhebt sich die Frage, ob die *vermehrte Wasserausscheidung der primäre Vorgang* und die Basenausfuhr die Folge ist oder ob umgekehrt die *primäre Steigerung der Basenausscheidung* die vermehrte renale Wasserabgabe nach sich zieht.

Vor der weiteren Verfolgung dieser Frage ist eine kurze Besprechung derjenigen Vorgänge nötig, welche sich in der Niere als Folge der NH_4Cl -Gabe abspielen. SARTORIUS, ROEMMELT u. PITTS haben gezeigt, daß bei 5 Tage langer Verabreichung von insgesamt 60 bzw. 75 g NH_4Cl nur während der ersten 3 Tage die vermehrte renale Chloridausscheidung mit einer Steigerung der Natriumausscheidung einhergeht. Letztere erreichte ihren Gipfel bereits am ersten Acidosetag, am vierten Tag waren die Kontrollwerte wieder erreicht. In dem Maße, wie die

Natriumausscheidung den Normalwerten sich näherte, stieg die NH_3 - und Kaliumausscheidung an. Vor allem NH_3 stellte in diesen Tagen den wesentlichen Neutralisationspartner für Chlorid dar. Interessanterweise war auch die Wassermehrausscheidung mit der resultierenden Verminderung des Körpergewichts nur während der ersten 3 Tage, also in der Zeit der vermehrten Natriumausscheidung, vorhanden.

GAMBLE, BLACKFAN u. HAMILTON, die bei ihren Messungen keine Verminderung der Basenkonzentration im Plasma fanden, neigten der Ansicht zu, daß der Wasserverlust als primärer Vorgang, die vermehrte Basenausscheidung dagegen als Folge anzusehen ist. In den hier vorgelegten Versuchen fällt dagegen die signifikante Abnahme der Natriumkonzentration im Plasma von $144,34 \pm 1,847$ auf $138,8 \pm 2,013$ mval/l auf. Daraus kann man den Schluß ziehen, daß die Natriummehrausscheidung diejenige des Wassers übersteigt. Auch SARTORIUS, ROEMMELT u. PITTS fanden bei ihren 2 Vpn., allerdings mit sehr viel höheren NH_4Cl -Dosen (60 bzw. 75 g), einen Abfall des Plasmanatriums.

Es liegt daher die Annahme nahe, daß der *Basenverlust den primären Vorgang, die Wasserausscheidung erst seine Folge* darstellt.

Eine klinisch gut bekannte und praktisch oft angewandte Tatsache ist die *Wirkungssteigerung der Quecksilberdiuretica durch acidotisch wirkende Salze*, besonders NH_4Cl .

Ursächlich wurde hierfür eine Zunahme der Acidität der Körperflüssigkeiten (KEITH u. WHELAN; BINGER u. KEITH; ETHRIDGE, MYERS u. FULTON), eine Zunahme der Harnacidität (NEWMAN) und eine Änderung der Anionenzusammensetzung des Plasmas (BINGER u. KEITH; BLUMGART, GILLIGAN u. VOLK; SCHROEDER) angenommen. Inzwischen durchgeführte Untersuchungen von AXELROD u. PITTS machen es unwahrscheinlich, daß die Zunahme der Acidität der Körperflüssigkeiten von Bedeutung ist, denn man kann durch CO_2 -Atmung dieselbe Aciditätssteigerung ohne Beeinflussung der Quecksilberdiurese erzeugen.

Dagegen ist die durch NH_4Cl -Verabreichung eintretende Steigerung der Chlorid- und Abnahme der Bicarbonatkonzentration als Erklärung am besten fundiert. Man beobachtet nämlich nach alleiniger Anwendung von Quecksilberdiuretika gerade umgekehrt eine Abnahme von $[\text{Cl}^-]$ und eine Zunahme von $[\text{HCO}_3^-]$: hypochlorämische Alkalose; $[\text{Na}^+]$ bleibt dagegen unverändert (BLUMGART, GILLIGAN und VOLK; FULTON u. Mitarb.; SCHWARTZ und WALLACE). Die gegenüber der Natrium- meist überwiegende Chloridausscheidung und die Abnahme von $[\text{Cl}^-]$ bei Zunahme von $[\text{HCO}_3^-]$ machen es wahrscheinlich, daß die primäre Wirkung der Quecksilberdiuretica eine Hemmung der tubulären Chloridrückresorption ist, die sekundär von einer vermehrten Natrium- und Wasserausscheidung gefolgt ist (SCHWARTZ und WALLACE; AXELROD und PITTS). Die hypochlorämische Alkalose ist gleichzeitig die häufigste Ursache für ein mangelhaftes Ansprechen bzw. refraktäres Verhalten gegenüber Quecksilberdiuretika. Diese Neigung zu *hypochlorämischer Alkalose* wird nun *durch NH_4Cl in idealer Weise beseitigt*. Damit entfällt aber der wesentliche diuresebeschränkende Faktor der Quecksilberwirkung. Man muß annehmen, daß auch andere acidotisch wirkende

Salze (Ammoniumnitrat, Calciumchlorid) über eine Erhöhung von $[Cl^-]$ und eine Abnahme von $[HNO_3^-]$, allerdings in vermindertem Ausmaß, wirken.

Auf andere Ursachen des refraktären Verhaltens gegenüber Quecksilberdiuretika, wie hochgradige Herabsetzung des Glomerulusfiltrates, vermehrte Nebennierenrindentätigkeit, Erhöhung des renalen Venendrucks usw. (WESTON, ESCHER, GROSSMAN u. LEITER), soll in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden.

Zusammenfassung.

An 11 weiblichen Versuchspersonen wurde der Einfluß von 30 g Ammoniumchlorid (561 mval Chlorid) auf Körpergewicht, Gesamtwasser (Antipyrin-Verteilungsvolumen), extracelluläre (Inulin-Verteilungsvolumen) und intracelluläre Flüssigkeit sowie die extracellulären Elektrolyte Natrium, Kalium, Chlorid und Bicarbonat untersucht. Das Ausmaß der erzielten Acidose wurde durch Messung des alveolaren CO_2 -Druckes, der Alkalireserve und der Pufferbasen beurteilt. 8 weibliche Versuchspersonen dienten als Vergleichsgruppe. Es fanden sich folgende Ergebnisse:

1. Das Körpergewicht nahm im Mittel um 1,1 kg ab. Das Gesamtwasser verminderte sich von 31,35 auf 30,09 Liter, also um 1,25 Liter. Die extracelluläre Flüssigkeit nahm im Mittel ebenfalls um 1,25 Liter, nämlich von 9,58 auf 8,33 Liter ab. Das intracelluläre Flüssigkeitsvolumen (Antipyrin-Inulin—Verteilungsvolumen) blieb mit 21,78 bzw. 21,76 Liter konstant. Der Verlust des Körpergewichts und des Gesamtwassers wird also bei der vorliegenden Versuchsanordnung und der verwendeten Methodik allein durch die Verminderung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens bewirkt.

2. Die Natriumkonzentration im Plasma nahm von 144,34 auf 138,8 mval/l ab. Die im Inulin-Verteilungsvolumen befindliche Natriummenge fiel von 1393,2 auf 1141,8, also um 251,4 mval ab. Die Chloridkonzentration stieg von 107,2 auf 112,13 mval/l an. Die Chloridmenge sank von 1111,3 auf 990,3 mval ab. Darin kommt der Verlust an chloridhaltiger extracellulärer Flüssigkeit zum Ausdruck. Dem Anstieg der Chloridkonzentration stand ein äquivalenter Abfall der Bicarbonatkonzentration von 22,81 auf 16,96 mval/l gegenüber. Die Bicarbonatmenge nahm von 235,0 auf 149,0 mval/l ab. Die Kaliumkonzentration zeigte keine signifikanten Veränderungen, die Kaliummenge nahm von 38,81 auf 31,96 mval ab.

3. Aus der Verminderung der Natriumkonzentration wird geschlossen, daß der Basenverlust als primärer Vorgang der Ammoniumchloriddiurese, die vermehrte Wasserausscheidung als dessen Folge anzusehen ist.

4. Auf die Beseitigung der nach alleiniger Anwendung von Quecksilberdiuretica auftretenden hypochlorämischen Alkalose durch Ammoniumchlorid wird hingewiesen.

Literatur.

- AXELROD, D. R., and R. F. PITTS: *J. Clin. Invest.* **31**, 171 (1952). — BERGER, E. Y., M. F. DUNNING, J. M. STEELE, R. JACKENTHAL and B. B. BRODIE: *Amer. J. Physiol.* **162**, 318 (1950). — BINGER, M. W., and N. M. KEITH: *J. Amer. Med. Assoc.* **101**, 2009 (1933). — BLUMGART, H. L., D. R. GILLIGAN and M. C. VOLK: *Medical Papers Dedicated to H. A. Christian*. Baltimore: Waverly Press 1936, 191. — BROCH, O. J.: *The Scand. J. Clin. a. Labor. Invest.* **5**, 9 (1953). — BRODIE, B. B., J. AXELROD, R. SOBERMAN and B. B. LEVY: *J. of Biol. Chem.* **179**, 25 (1949). — COMROE, J. H., and P. WALTER: *Amer. J. Physiol.* **152**, 356 (1948). — COTLOVE, E.: *Federat. Proc.* **11**, 28 (1952). — DEANE, N., M. ZIFF and H. W. SMITH: *J. Clin. Invest.* **31**, 200 (1952). — DEANE, N., and H. W. SMITH: *J. Clin. Invest.* **31**, 197 (1952). — DEUTSCH, E.: *Klin. Med. (Wien)* **4**, 81 (1949). — DOERING, P.: In Vorbereitung. — DÖRING, G. K., u. H. H. LOESCHCKE: *Pflügers Arch.* **249**, 437 (1947). — DÖRING, G. K.: *Pflügers Arch.* **250**, 694 (1948). — DÖRRIE, H., E. GÖLTNER u. M. SCHWAB: *Klin. Wschr.* **1954**, 165. — DUGGAN, J. J., and R. F. PITTS: *J. Clin. Invest.* **29**, 365, 372 (1950). — ETHRIDGE, C. B., D. W. MYERS and M. N. FULTON: *Arch. Int. Med.* **57**, 714 (1936). — FINKENSTAEDET, J. F., M. P. O'MEARA and J. P. MERRILL: *J. Clin. Invest.* **31**, 515 (1952). — FITZGERALD, M. P., and J. S. HALDANE: *J. of Physiol.* **32**, 486 (1905). — FULTON, M. N., H. A. VAN ANKEN, R. J. PARSONS and L. F. DAVENPORT: *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **50**, 223 (1934). — GAMBLE, J. L.: *Chemical Anatomy, Physiology and Pathology of Extracellular Fluid*. Cambridge 1950. — GAMBLE, J. L., K. D. BLACKFAN and B. HAMILTON: *J. Clin. Invest.* **1**, 359 (1924/25). — GAUDINO, M., and M. F. LEVITT: *Amer. J. Physiol.* **157**, 387 (1949). — GOODLAND, R. L., and W. T. POMMERENKE: *Fertility and Sterility* **3**, 394 (1952). — GOODMAN, L., and A. GILMAN: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York 1941. — HASTINGS, A. B., and J. SENDROY jr.: *J. of Biol. Chem.* **61**, 695 (1924). — HEERHABER, J.: *Pflügers Arch.* **250**, 385 (1948). — HENDERSON, L. J.: *Blut*. Deutsche Ausgabe. Dresden und Leipzig 1932. — JULICH, H.: *Z. exper. Med.* **121**, 131 (1953). — KEITH, N. M., and M. WHELAN: *J. Clin. Invest.* **3**, 149 (1926/27). — KOCH, R., u. M. SCHWAB: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 145 (1954). — KRUGHÖFFER, P.: *Acta physiol. scand. (Stockh.)* **11**, 1 (1946). — LAST, J. H., R. A. JONES, G. O. McDONALD and E. E. BOND: *Federat. Proc.* **11**, 367 (1952). — LEVITT, M. F., and M. GAUDINO: *Amer. J. Med.* **9**, 208 (1950). — LOESCHCKE, H. H., u. K. H. SOMMER: *Pflügers Arch.* **248**, 405 (1944). — LOESCHCKE, H. H.: *Pflügers Arch.* **252**, 301 (1950). — NEWMAN, E. V.: *Bull. Hopkins Hosp.* **81**, 430 (1947). — NICHOLS, G., jr., N. NICHOLS, W. B. WEIL and W. M. WALLACE: *J. Clin. Invest.* **32**, 1299 (1953). — OEHME, C.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **104**, 115 (1924). — OPITZ, E., u. H. BARTELS: *Hoppe-Seyler-Thierfelder: Abschnitt „Gasanalysen“* in *Handb. d. physiol. u. pathologisch-chem. Analyse*. 10. Aufl. Herausgegeben von K. Lang u. E. Lehnartz. I. Bd., 2. Teil (im Druck). — PETERS, J. P., and D. D. VAN SLYKE: *Quantitative Clinical Chemistry*. Volume II. Baltimore 1932. Deutsche Übersetzung in *Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden*, Abt. V, Teil 10, 1. Hälfte, S. 245 ff. Berlin-Wien 1938. — PRENTICE, T. C., W. SIRI, N. J. BERLIN, G. M. HYDE, R. J. PARSONS, E. E. JOINER and J. H. LAWRENCE: *J. Clin. Invest.* **31**, 412 (1952). — RILEY, R. L., J. L. LILIENTHAL, D. D. PROEMMEL and R. FRANKE: *Amer. J. Physiol.* **147**, 191 (1946); siehe auch LOESCHCKE, H. H.: *Klin. Wschr.* **1954**, 145. — ROUGHTON, F. J. W., R. C. DARLING and W. S. ROOT: *Amer. J. Physiol.* **142**, 708 (1944). —

SARTORIUS, O. W., J. C. ROEMMELT and R. F. PITTS: *J. Clin. Invest.* **28**, 423 (1949). — SCHLOERB, P. R., B. J. FRIIS-HANSEN, J. S. EDELMAN, A. K. SOLOMON and F. D. MOORE: *J. Clin. Invest.* **29**, 1296 (1950). — SCHWARTZ, J. L., D. SCHACHER and N. FREINKEL: *J. Clin. Invest.* **28**, 1117 (1949). — SCHWARTZ, W. E., and W. M. WALLACE: *J. Clin. Invest.* **30**, 1089 (1951). — SCHROEDER, H. A.: *J. Amer. Med. Assoc.* **141**, 117 (1949). — SINGER, R. B., and A. B. HASTINGS: *Medicine* (Baltimore) **27**, 223 (1948). — SMITH, H. W.: *The Kidney*. New York 1951. — SOBERMAN, R. J.: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **74**, 789 (1950). — SOBERMAN, R., B. B. BRODIE, B. B. LEVY, J. AXELROD, V. HOLLANDER and J. M. STEELE: *J. of Biol. Chem.* **179**, 31 (1949). — WESTON, R. E., J. GROSSMAN and L. LEITER: *J. Clin. Invest.* **30**, 1262 (1951). — WESTON, R. E., D. J. W. ESCHER, J. GROSSMAN and L. LEITER: *J. Clin. Invest.* **31**, 901 (1952). — WOOD, E. H., and L. CRONIN: *Amer. J. Physiol.* **155**, 478 (1948).

Priv.-Doz. Dr. MAX SCHWAB, Göttingen, Med. Univ.-Klinik.

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften Berlin
Institut für Medizin und Biologie Berlin-Buch
(Direktor: Prof. W. FRIEDRICH)
und der II. Med. Klinik der Charité Universitätskliniken Berlin
(Direktor: Prof. Dr. A. KRAUTWALD).

Versuche zur Beeinflussung der Cancerogenese durch 1-Isopropyl-5-methyl-azulen.

Von

H. BARTON, U. HEINE, A. GRAFFI und F. JUNG.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juli 1954.)

Nach den Untersuchungen von DEELMAN, BERENBLUM, GRAFFI besteht die Geschwulstbildung durch einen cancerogenen Kohlenwasserstoff aus einem komplexen Vorgang. An diesem sind mindestens zwei Phasen zu unterscheiden. Ein Initialvorgang, ein zellulärer Mutationsvorgang, der in Anlehnung an FISCHER-WASELS als Tumorneubildungsanlage bezeichnet werden kann. Superregeneratorische, entzündliche Prozesse realisieren die Tumorneubildungsanlagen zu Tumoren. Einer der wirksamsten cancerogenen Kohlenwasserstoffe ist das 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen (DMBA). Diese Substanz besitzt beide Wirkungskomponenten. In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, daß die Azulene deutlich entzündungshemmende Eigenschaften besitzen und in vitro eine Steigerung der Leukozytenfunktionen hervorrufen (JUNG, BARTON, REINEKE). In diesem Zusammenhang erschien es uns interessant, die Wirkungseigenschaften des 1-Isopropyl-5-methyl-azulens (A 18) auf die Wirkungskomponenten dieses cancerogenen Kohlenwasserstoffes zu untersuchen.

Methodik.

Die Versuche wurden an weißen Mäusen, 18—22 g schwer, beiderlei Geschlechtes, durchgeführt. Die DMBA-Applikation erfolgte durch einmalige Auftropfung ständig einheitlicher Mengen (3 Tropfen mit Pipetten gleichen Volumens) einer 0,2%igen DMBA-Lösung in Aceton auf die Rückenhaut. Das Azulen wurde 0,04- und 0,2%ig in Aceton gelöst und in der gleichen Menge wie oben getropft oder in Konzentrationen von 0,04 mg und 0,4 mg/Tier in einer 10%igen Serum-NaCl Emulsion unter die Tropfstelle injiziert. Die Kontrolltiere erhielten die 10%ige Serum-NaCl-Verdünnung in gleichen Mengen und in gleicher Häufigkeit subcutan unter die Rückenhaut injiziert. In beiden Fällen wurde vor der Schädigung durch das Cancerogen 2 Tage lang mit Azulen vor- und 12—14 Tage lang nachbehandelt.

Die Injektionen erfolgten 2mal täglich in Mengen von 0,5 ml. In Kurzversuchen (Versuchsgruppe 1) wurden im Verlauf von 14 Tagen je 2 Tiere jeden 2. Tag getötet und die Veränderungen der Haut histologisch beurteilt. In den Versuchen, in welchen es uns auf die Beurteilung der makroskopischen Erscheinungen ankam, wurden 6 Wochen bis 5 Monate nach abgeklungener Erstreaktion die gutartigen Geschwülste, Warzen, Papillome mit Crotonöl — 5%ig in Paraffinöl gelöst —, einmal wöchentlich provoziert (Zweitreaktion, Versuchsgruppe 2). Die aufgetretenen

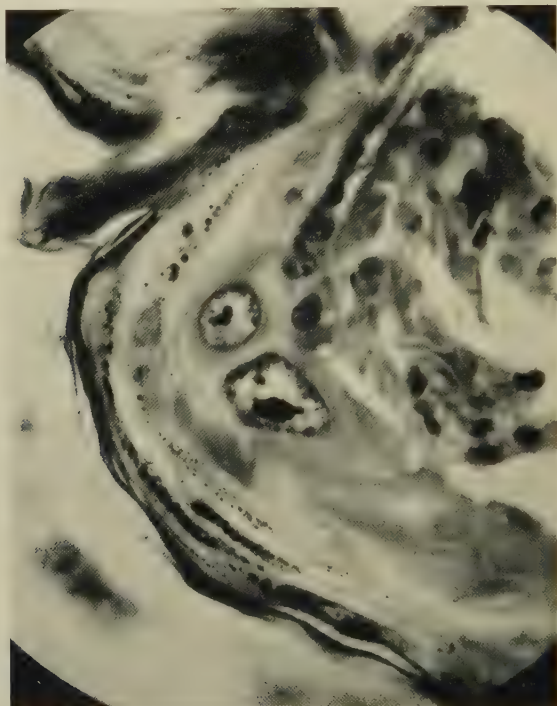


Abb. 1. Mäusehaut am 6. Tag nach Tropfung mit 0,2% DMBA. In der stark verbreiterten Epidermis treten in der Basalzellschicht und im Strat. spinosum die für die Cancerogenwirkung typischen großen Zellkerne auf.

Hautveränderungen der Erstreaktion wurden qualitativ nach der Reaktionstärke R0 bis R3 bezeichnet. Die Fläche des Haarausfalls wurde planimetriert und statistisch ausgewertet.

- R0: Schütterer Haarausfall.
- R1: Stellenweiser Haarausfall.
- R2: Flächenhafter Haarausfall.
- R3: Schorf- und Nekrosebildung.

In einer 3. Gruppe wurden die Tiere jeden 2. Tag einmal mit 3 Tropfen einer 0,004%igen DMBA in 0,04%iger Azulen-Aceton-Lösung getropft bis zur Gesamtzahl von 50 Applikationen. Für diese Gruppe wurden Inzuchtstämme verwandt.

Ergebnisse.

Versuchsgruppe 1. 45 Tiere wurden einmalig mit einer 0,2%igen DMBA-Lösung getropft. Davon wurden 15 Tiere mit einer 0,2%igen Azulenlösung 12 Tage lang nachgetropft, weiteren 15 Tieren $2 \times$ täglich 0,4 mg und 0,04 mg Azulen s. c. injiziert. Zur Kontrolle wurden 15 weitere Tiere nur mit einer 0,2%igen Azulen-Aceton-Lösung behandelt.

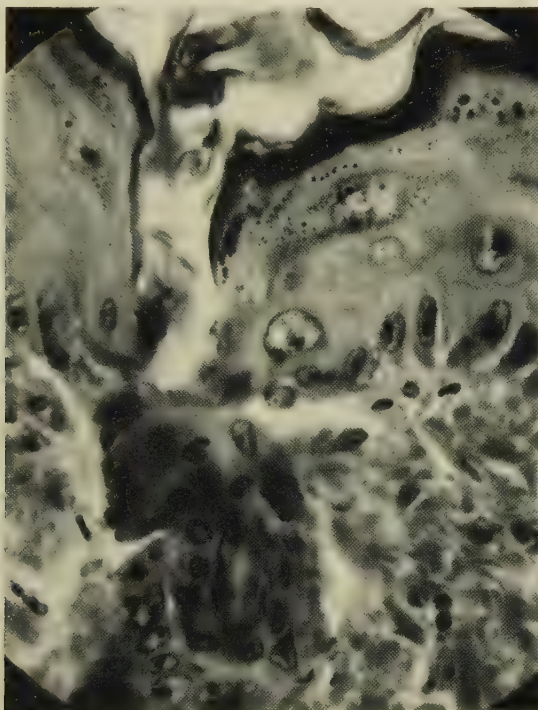


Abb. 2. Mäusehaut am 6. Tag nach Tropfung mit 0,2% DMBA und fortlaufender Tropfung mit 0,2% Azulen. In den einzelnen Hautschichten treten die gleichen DMBA-Reaktionen auf.

Von jeder Gruppe wurden jeden zweiten Tag zwei Tiere getötet, die getropfte Hautstelle histologisch beurteilt. Die Versuchs- und Kontrolltiere zeigten unterschiedslos qualitativ und quantitativ histologisch die gleichen Erstreaktionen, die für die Cancerogene von PULLINGER, HAMPERL, GRAFFI, LANGER, HEINE beschrieben worden sind. Weder die entzündlich superregeneratorische Phase, die auch auf einen unspezifisch entzündlichen Reiz, z. B. Crotonöltropfung allein einsetzt, noch die für das Cancerogene typischen Reaktionen, wie Kernpolymorphie, Kernpyknose, Riesenzellbildung, wurden beeinflusst. Das Azulen in einer 0,2%igen Lösung wurde völlig reaktionslos aufgenommen.

Versuchsgruppe 2. 80 Tiere wurden mit einer 0,2% igen DMBA-Lösung getropft. Im Anschluß daran wurden 40 Tieren täglich zweimal 0,4 mg Azulen s. c. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten über die gleiche Zeit

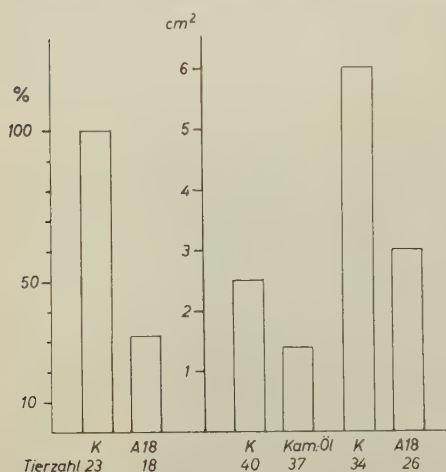


Abb. 3. Abszisse: K Kontrolltiere, A Versuchstiere. Azuleninjektionen 0,4 mg/Tier.

Ordinate: Links Haarausfallfläche in Prozent. Rechts in Quadratzentimeter. Der Haarausfall ist bei den Azulentieren signifikant gehemmt.

Serum-NaCl-Injektionen. Von der sechsten Woche ab wurde 5% iges Crotonöl nachgetropft. Aus der Abb. 3 geht hervor, daß der Haarausfall der als Initialvorgang regelmäßig nach einmaliger oder fortlaufender Tropfung mit einem Cancerogen im Verlauf der Erstreaktion auftritt, bei den Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren signifikant (3σ) gehemmt wird. In zwei weiteren Versuchen wurde die Hemmung des Haarausfalles unter gleichen Versuchsbedingungen reproduziert. In einem der Versuche wurde chromatographisch gereinigtes Kamillenöl verwandt. Die Aus-

wertung erfolgte am 16. Tag nach DMBA-Tropfung.

Die Zweitreaktion, Entstehung von Warzen und Papillomen nach Crotonölprovokation geht aus folgender Tabelle hervor. Bei dieser Versuchsanordnung wurden solide Hautcarcinome nicht erwartet, weil die

Azulen $2 \times 0,4$ mg und DMBA 0,2%.

Datum	R0	R1	R2	R3	Nekrose	Warzen	Anzahl der Tiere
4. 10. 51	—	8	6	—	—	—	14
8. 11. 51	1	12	1	—	—	—	14
1. 12. 51	1	11	2	—	—	—	14
7. 2. 52	1	11	1	—	1	—	14
3. 4. 52	—	6	3	—	—	—	9
4. 6. 52	—	3	1	—	—	—	4

Kontrolle/Serum-NaCl und DMBA 0,2%.

4. 10. 51	3	3	12	—	—	—	17
8. 11. 51	1	8	4	—	—	1 (1)	15
1. 12. 52	—	7	3	—	2	3 (3)	15
7. 2. 52	—	6	2	—	2	21 (6)	15
3. 4. 52	—	2	3	—	—	*17 (6)	11
4. 6. 52	—	2	—	—	—	10 (3)	5

* Verschmelzung mehrerer kleiner Warzen zu einer größeren.

Zeit bis zu ihrer Realisierung praktisch nicht erreicht werden konnte. Die Versuchstiere starben vorher aus.

In Abb. 4 und 5 wurden die Beeinflussung der Zweitreaktion mit 0,4 mg Azulen reproduziert und mit 0,04 mg Azulen erweitert. Bei

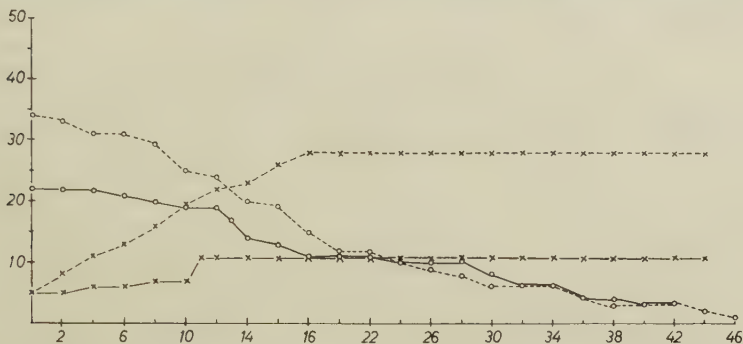


Abb. 4. Abszisse: Versuchswochen nach Auftreten der 1. Warze. Ordinate: Anzahl der Tiere und Warzen. ○—○ Azulentierte, ×—× Azulenwarzen. ○----○ Kontrolltiere, ×----× Kontrollwarzen. Bei den mit Azulen 0,4 mg behandelten Tieren tritt eine mehr als 50%ige Hemmung der Warzenbildung auf.

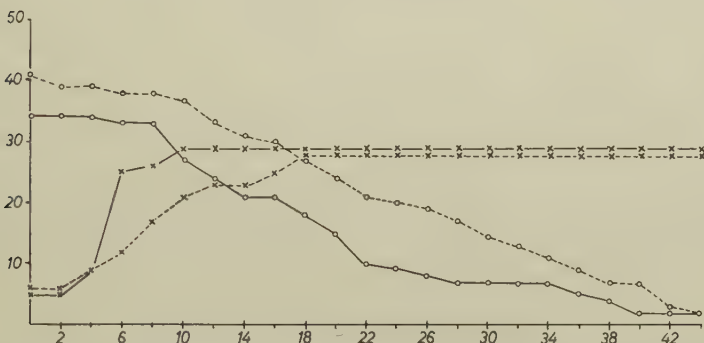


Abb. 5. Abszisse: Versuchswochen nach Auftreten der 1. Warze. Ordinate: Anzahl der Tiere und Warzen. ○—○ Kontrolltiere, ×—× Kontrollwarzen, ○----○ Azulentierte, ×----× Azulenwarzen. Nach Azuleninjektion von 0,04 mg/Tier besteht im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Warzen.

0,4 mg/Tier wurde wiederum eine mehr als 50%ige Hemmung der Warzenbildung gegenüber den Kontrolltieren erreicht, während nach der 10fach geringeren Azulendosis kein Unterschied zwischen der Anzahl der Warzen der Versuchs- und Kontrolltiere ersichtlich ist.

Versuchsgruppe 3. 100 Tiere wurden jeden zweiten Tag einmal mit einer 0,004% igen DMBA in 0,04% iger Azulen-Aceton-Lösung bis zur Gesamtzahl von 50 Applikationen getropft. Der Kontrollversuch dazu ohne Azulen wurde den Protokollen von GRAFFI entnommen. Nach diesen

treten 67 Tage nach Versuchsansatz die ersten Warzen auf und 134 Tage nach der ersten Tropfung die ersten Carcinome. Nach gleichzeitiger Behandlung mit Azulen traten die ersten Warzen 97 Tage und die ersten Carcinome 174 Tage nach Versuchsansatz auf. Signifikante Unterschiede in der Warzen- und Carcinomanzahl sind zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren nicht vorhanden.

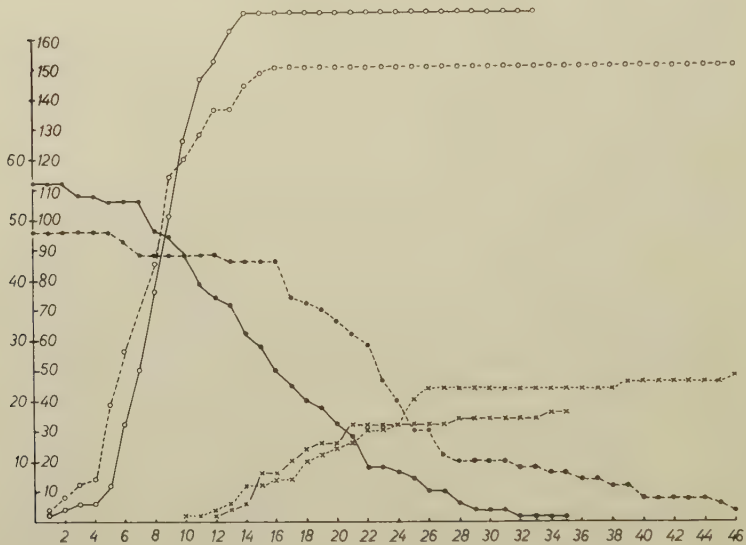


Abb. 6. Abszisse: Versuchswochen nach Auftreten der 1. Warze. Ordinate: Links Anzahl der Tiere und Carcinome. Rechts Anzahl der Warzen. •—•—• Azulentiere. ○—○—○ Azulenwarzen. ×—×—× Azulencarcinome. •—•—• Kontrolltiere. ○—○—○ Kontrollwarzen. ×—×—× Kontrollcarcinome. Nach einer 50maligen Tropfung einer 0,04% igen Azulen- und 0,004% igen DMBA-Lösung werden weder die Warzenbildung noch die Ca-Entstehung gehemmt.

Zusammenfassung und Diskussion.

Aus den Versuchen geht hervor, daß nach s. c. Injektion von 2 × täglich 0,4 mg Azulen/Tier 14 Tage lang unter die durch DMBA geschädigte Hautstelle mit Sicherheit der Haarausfall und wahrscheinlich auch die Warzenbildung eingeschränkt wird. Eine 10fach geringere Dosis ist wirkungslos. Die Auftropfung des Azulens in einer 0,04 kombiniert mit einer 0,004% igen DMBA-Lösung über eine Zeit von 100 Tagen, hat auf die Entstehung von gutartigen Tumoren und soliden Hautcarcinomen ebenfalls keinen Einfluß. Histologisch erscheinen weder die spezifischen noch die unspezifischen superregeneratorischen-entzündlichen Reaktionen auf das DMBA durch das Azulen qualitativ und quantitativ beeinflusst. Die beobachteten Wirkungen des Azulens sind jedenfalls nach unseren Ergebnissen morphologisch-histologisch nicht zu erklären.

Literatur.

- BARTON, H., u. M. WENDLER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 573 (1952).
 — BERENBLUM, I.: Le Problème biologique du cancer. Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta varia **7**, 1 (1949). — DEELMAN, Z. Krebsforsch. **21**, 220 (1924); **37**, 383 (1932). — FISCHER-WASELS, B.: Handbuch der normalen u. pathologischen Physiologie, Bd. 14, S. 2, 1927. — GRAFFI, A.: Z. Krebsforsch. **54**, 360 (1943). — Arch. Geschwulstforsch. **1**, 61 (1949); **2**, 1 (1950); **3**, 212 (1951). — HAMPERL, H., A. GRAFFI u. E. LANGER: Z. Krebsforsch. **53**, 133 (1943). — HEINE: U.: Diss. Berlin 1953. — JUNG, F., W. SCHOETENSACK u. G. BRUNO: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 1 (1951). — JUNG, F., W. SCHOETENSACK, E. MAHLER u. L. BURCKHARD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 255 (1951). — PULLINGER: J. of Path. **50**, 463 (1940). — REINECKE, M., H. BARTON u. F. JUNG: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 579 (1952).

Dr. med. HELMUT BARTON, II. Med. Univ. Klinik der Charité, Berlin NW 7, Schumannstr. 21.

Aus der Pharmakologischen Abteilung der ASTA-Werke AG.,
Chemische Fabrik, Brackwede i. W.

Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen im Tierversuch.

Ein Beitrag zur Prüfungsmethodik entzündungswidriger Substanzen.

Von

NORBERT BROCK, JUTTA KOTTMEIER, DIETRICH LORENZ und HELMUT VEIGEL.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Juli 1954.)

Im Zusammenhang mit synthetischen Arbeiten von H. ARNOLD auf dem Gebiet der Azulenchemie ergab sich in unserem Arbeitskreis die Notwendigkeit einer pharmakologischen Charakterisierung von Azulenen, um eine Grundlage für das Studium der Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer — antiphlogistischer — Wirksamkeit zu gewinnen. Diese Aufgabe schien in Kenntnis der zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Befunde, die auf dem Gebiet der natürlichen Kamillenwirkstoffe sowie der synthetischen Azulenderivate in den letzten 20 Jahren bereits erarbeitet wurden^{1, 2, 4, 6, 7, 9–17, 21–28}, keine besonderen Schwierigkeiten zu bieten. In diesen Arbeiten war der Nachweis versucht worden, daß die antiphlogistische Wirksamkeit der Kamille auf einen ringförmigen Kohlenwasserstoff, das Chamazulen, zu beziehen sei. Darüber hinaus erwiesen sich auch bestimmte synthetische Azulene als antiphlogistisch wirksam; hierbei wurde bereits unternommen, Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung zu erarbeiten^{13–16, 25}. Führt man sich diese zahlreichen experimentellen Ergebnisse und klinischen Berichte vor Augen, so scheint es, als ob der therapeutische Nutzen der Azulene weitgehend gesichert sei.

In den erwähnten tierexperimentellen Untersuchungen gingen die Autoren methodisch so vor, daß sie zunächst auf chemischem oder physikalischem Wege eine Entzündung setzten und dann den Entzündungsverlauf mit und ohne Azulenbehandlung verfolgten. Bei diesem Vorgehen handelte es sich nicht um ein prophylaktisches Verfahren entsprechend den alten Versuchen von CHIARI u. JANUSCHKE mit Calciumverbindungen, vielmehr wurde der Einfluß auf die *voll entwickelten* Entzündungserscheinungen studiert. Beliebte Testobjekte waren die Augen von Kaninchen und Meerschweinchen. Die Azulenapplikation erfolgte lokal in Form von öligen Lösungen, Salben oder wäßrigen Emulsionen.

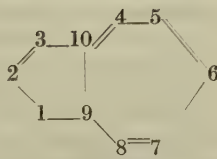
Allen Methoden, die unter diesen Gesichtspunkten ausgearbeitet wurden, haftet jedoch der grundsätzliche Nachteil an, daß die Beurteilung des jeweiligen

Entzündungs- bzw. Abheilungsgrades *subjektiv* erfolgt. Man versuchte, „eindrucks-mäßig“ die Stärke der Entzündungserscheinungen in ihren verschiedenartigen Auswirkungen vergleichend zu bewerten und hieraus Schlußfolgerungen auf den etwaigen Heileffekt zu ziehen. Der Nachteil der *Subjektivität* trifft letzten Endes auch für das „halbquantitative“ Auswertungsverfahren von JUNG u. Mitarb. zu^{13-16, 25}. Diese Autoren belegten den jeweiligen Entzündungsgrad des Meer-schweinchenauges nach Senföleizung mit Maßzahlen und bauten auf diesem sub-jektiv gewonnenen Zahlenmaterial eine statistische Auswertungsmethode auf, mit deren Hilfe sie zu weitreichenden Schlußfolgerungen hinsichtlich der Wirksamkeit und des Wirkungsmechanismus verschiedener Azulene gelangten.

Zu einer objektiven Beurteilung des Entzündungsgrades am Kaninchenauge gelangten KÜCHLE u. LOESER. Mit einem einfachen mechanischen Meßgerät er-faßten sie quantitativ das Ödem der Conjunctiva tarsi, das sich regelmäßig nach Reizeinwirkung in Form einer Zunahme der Liddicke ausbildet. Mit dieser Methode wurde im gleichen Arbeitskreis die antiphlogistische Wirkung einer *parenteralen* Applikation verschiedener Antihistamine, Flavon-Glykoside oder Calciumverbindungen näher untersucht, eine Prüfung von Azulen indes nicht vor-genommen.

Um eine Ausgangsbasis für die eigene Auswertung von Azulen zu gewinnen, versuchten wir zunächst, die grundlegenden Ergebnisse der bisherigen Untersucher mit Hilfe der von den Autoren selbst angewen-deten Methoden zu reproduzieren. Als Testsubstanzen dienten hierbei Kamillenöl, Chamazulen und zwei synthetische Azulene (Tab. 1).

Tabelle 1. Zusammenstellung der in dieser Arbeit geprüften Azulene*.

Präparat	Chemische Bezeichnung
	
A 18	1-Isopropyl-5-methyl-azulen
Guajazulen	1,4-Dimethyl-7-isopropyl-azulen
Chamazulen	1,4-Dimethyl-7-äthyl-azulen

* Das Azulen A 18 wurde durch Herrn Dr. habil. H. ARNOLD synthetisiert. Als Guajazulen verwendeten wir ein von uns gereinigtes Präparat der Fa. Dragoco, Holzminden.

Als weitere Aufgabe nahmen wir uns vor, die antiphlogistische Wirk-samkeit der Azulene unter Ausschaltung der erwähnten *subjektiven* Ein-flüsse mit Hilfe einer *objektiven quantitativen* Auswertung zu prüfen. Hierzu entwickelten wir auf der Grundlage des Verfahrens von KÜCHLE und LOESER an der strahlenbedingten Entzündung (Ultraviolett) des Kanincherauges eine eigene Testmethode.

A. Allgemeine Methodik.

Die wasserunlöslichen Azulene wurden in Olivenöl gelöst (bis 2%) oder in physiologischer NaCl-Lösung emulgiert (0,01—0,25%). In letzterem Fall erfolgte

die Verteilung mit Hilfe eines Ultraschallgerätes* bzw. in einem hochtourigen Emulgator**. Die Größe der kleinen Tröpfchen wurde mikroskopisch kontrolliert und lag bei 2—14 μ , die Mehrzahl etwa bei 5 μ . In einzelnen Versuchen wählten wir zur Stabilisierung einen Zusatz von Cholesterin (0,065%) bzw. von Apfelpektin (0,5%).

Das reine Chamazulen sowie der alkoholische Kamillenextrakt wurden aus den getrockneten Blütenköpfen deutscher Kamille (*Matricaria chamomilla*) gewonnen. Bei Anwendung des Extraktes lösten wir den Wirkstoff aus 1 g Flores Chamomillae in 1 ml Olivenöl auf. Bestimmungen des Azulengehaltes nahmen wir in dem Extrakt nicht vor. Als Kontrolle verwendeten wir jeweils die entsprechenden azulenfreien Lösungs- bzw. Emulgierungsmittel.

Auf Grund der Angaben von JUNG u. Mitarb.²⁵ soll die Wirkung des synthetischen Azulens A 18 mit dem Alter des Präparates zunehmen. Wir zogen infolgedessen auch Präparate, die natürlich oder künstlich (UV-Bestrahlung) gealtert waren, zu unseren Untersuchungen mit heran.

B. Untersuchungen an der Senföle ntzündung des Kaninchenauges nach HEUBNER und GRABE.

1. *Zur Versuchstechnik.* Nach den Angaben von HEUBNER u. GRABE applizierten wir Kaninchen eine 30%ige Lösung von Allylsenfö l (in Olivenöl) in den Conjunctivalsack des re. und li. Auges, und zwar je 1 Tropfen zweimal hintereinander im Abstand von 5 min. Die Behandlung mit den Testsubstanzen Chamazulen, A 18 und Kamillenöl, die jeweils in das li. Auge eingeträufelt wurden, begann 15 min nach der zweiten Senfö lapplikation. Das re. Auge erhielt zur Kontrolle die entsprechenden azulenfreien Lösungsmittel. Die Behandlung wurde alle 15 min mit insgesamt 10, in Einzelfällen sogar bis 15 Einträufelungen fortgeführt.

Dabei wurden die Entzündungserscheinungen eindrucksmäßig nach der Schwere der conjunctivalen Gefäßreaktion, der Chemosis, des Lidödems und der Cornealtrübung beurteilt und bis zum Abklingen verfolgt. Mit dieser Methode beobachteten HEUBNER u. GRABE erstmalig eine antiphlogistische Wirkung von Azulen.

In unseren Versuchen bestand jede Versuchsgruppe aus 30 Tieren. Zusätzlich blieb eine gleichgroße Gruppe von Tieren nach der Senfö lapplikation auf beiden Augen unbehandelt, einerseits, um ein Maß über die Reaktionsfähigkeit *verschiedener* Tiere zu gewinnen, andererseits aber auch, um den Entzündungsverlauf beider Augen an *ein und demselben* Tier beurteilen zu können.

2. *Ergebnisse.* Schon die Kontrollversuche zeigten, daß die Entwicklung und der Ablauf der Entzündung trotz Schaffung möglichst gleicher Ausgangsbedingungen (Tiere gleichen Alters, Körpergewichts, gleicher Rasse, Außentemperatur, Nahrung usw.) mit einer überraschend hohen Streuung belastet sind. So ergaben sich in der unbehandelten Kontrollgruppe nicht nur starke Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft der Einzeltiere, sondern häufig sogar zwischen den beiden Augen ein und desselben Tieres. Bei etwa 10 von 30 Tieren war der Unterschied im Entzündungsverlauf der beiden Augen so stark, daß hierdurch ohne weiteres kräftige therapeutische Effekte hätten vorgetäuscht werden können.

* Fokussierter Unterwasserschwinger, 175 kHz, 1600 W Schwingerleistung. Atlas-Werke Bremen.

** Ultra-Turrax TV 45, Jahnke & Kunkel KG., Staufen/Br.

Diese Erfahrungen bestätigen die kürzlich mitgeteilten Beobachtungen von KOLLMANNSPERGER u. OETTEL. Diese Autoren hatten sich unter Anwendung eines — allerdings wie in den Versuchen von JUNG *subjektiv* gewonnenen — Punktsystem einen gewissen zahlenmäßigen Überblick über die Fehlerbreite der Methode verschafft; hierbei hatten sie ebenfalls eine große Streuung festgestellt. HEUBNER⁸ wies im Anschluß an diese Mitteilung auf die erheblichen Schwierigkeiten hin, die der Beurteilung entzündungswidriger Wirkungen entgegenstehen; er sieht den Grund hierfür nicht zuletzt in der Tatsache, daß man in diesen Versuchen stets mit einer *doppelten* Streuung rechnen müsse, nämlich der Entzündungsentwicklung einerseits und der pharmakotherapeutischen Beeinflussung andererseits.

Angesichts der großen Fehlerbreite des *unbeeinflussten Entzündungsablaufs* erscheint eine *quantitative* Bewertung antiphlogistischer Effekte mit dieser Methode von vornherein kaum möglich; selbst eine *qualitative* Beurteilung kann nur mit besonderer Kritik und Vorsicht erfolgen. Trotz dieser Einschränkungen führten wir zahlreiche therapeutische Versuche mit Chamazulen, A 18 und Kamillenöl unter Einsatz großer Tierzahlen durch. Niemals ließ sich jedoch ein eindeutiger therapeutischer Erfolg der verwendeten Azulene sicherstellen. Die Heilungstendenz der ausgelösten Entzündungsprozesse erwies sich mit und ohne Behandlung praktisch in allen Gruppen gleich.

Aus diesem Grunde wandten wir uns nunmehr dem Verfahren von JUNG an der Senfölschemosis des Meerschweinchenauges zu.

C. Untersuchungen an der Senfölschemosis des Meerschweinchenauges nach JUNG und Mitarb.^{13—16, 25}.

1. *Zur Versuchstechnik.* Hinsichtlich der Durchführung der Versuche und der Bewertung der Ergebnisse hielten wir uns streng an die methodischen Angaben von JUNG u. Mitarb.*.

Die Meerschweinchen erhielten an 2 aufeinanderfolgenden Tagen morgens und abend jeweils 1 Tropfen einer 50%igen Lösung von Allylsenöl in den Conjunctivalsack instilliert. Im allgemeinen genügten 4 Träufelungen, um eine gleichmäßige, stark entzündliche Reaktion zu erhalten. In Einzelfällen mußte bei der 3. bzw. 4. Applikation eine höhere Konzentration verwendet werden, um eine zu schwach entwickelte Reaktion zu verstärken. Nach Festsetzung des Ausgangsbefundes konnten wir am 3. Tag mit der Behandlung beginnen. Als Testsubstanz wählten wir Chamazulen und A 18 aus, letzteres in „reiner“ und „gealterter“ Form²⁵. Die Azulene waren in physiologischer NaCl-Lösung emulgiert; vor Versuchsbeginn wurde der Test- sowie der Kontrolllösung Penicillin-„Bayer“ 10000 E/ml zugesetzt, da hierdurch eine Verringerung der Fehlerbreite (Ausschaltung von Sekundärinfektionen) erreicht werden soll²⁵.

Entsprechend den Angaben von JUNG u. Mitarb. applizierten wir die Prüf-lösungen anfänglich grundsätzlich in das re. Auge, die Kontrolllösungen dagegen in das li. Auge der Meerschweinchen. In späteren Versuchsreihen wurde jedoch die

* Wir möchten an dieser Stelle Herrn Professor JUNG, Pharmakologisches Institut der Humboldt-Universität Berlin und Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften, Berlin-Buch, sehr herzlich dafür danken, daß er uns die Einarbeitung in seine Methodik in seinem Institut ermöglichte.

Behandlung wahllos am li. oder am re. Auge durchgeführt, wobei den beiden zur Beurteilung eingesetzten Mitarbeitern nicht bekannt war, welches Auge jeweils die Test- bzw. die Kontrolllösung erhalten hatte („Blindversuch“). Auf den Einsatz einer Kontrollgruppe zur Bestimmung der Fehlerbreite der Methode wurde in diesen Untersuchungen verzichtet, da sich der Fehler im Rahmen der Auswertung ohnedies zahlenmäßig erfassen ließ.

Die Versuche bedeuten für die Meerschweinchen eine erhebliche Belastung. Trotz Anwendung von Einzelkäfigen und guter Belüftung kann es zu Senföf-bedingten Pneumonien kommen, so daß die Tiere bereits während der Behandlungsperiode eingehen. Die Empfindlichkeit war nach verschiedenen Stichproben offensichtlich nicht gleichmäßig, in einzelnen Gruppen war keinerlei Allgemeinschädigung feststellbar, in anderen war eine Sterblichkeit von 10, 20, sogar von 30% zu beobachten.

Die Bewertung stützt sich auf die Berechnung der „Wirksamkeit“ der geprüften Azulene, ein Begriff, der von JUNG näher definiert wurde. Zu diesem Zweck ermittelten wir zunächst den sogenannten „durchschnittlichen täglichen Heilerfolg am Einzeltier“ und anschließend hieraus für jede Stichprobe den Mittelwert und seinen mittleren Fehler. Diese beiden Parameter stellen die Maßzahlen für die „Wirksamkeit“ des geprüften Azulens dar. Zur Fehlerberechnung zogen wir die Gesamtzahl der Einzelbeobachtungen pro Tag und pro Tier heran. Darüber hinaus führten wir auch — entsprechend den Angaben von JUNG — in verschiedenen Gruppen die Berechnung der „Wirksamkeit bis zu einem bestimmten Tage“ durch und waren so in der Lage, den täglichen Heilerfolg über die ganze Versuchsperiode hin auch graphisch darzustellen.

2. *Ergebnisse.* Die wesentlichen Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tab. 2 zur Darstellung gebracht. Während Chamazulen von vorn-

Tabelle 2. *Ergebnisse der Untersuchungen mit Azulen A 18 und Chamazulen an der Senföf-entzündung des Meerschweinchenauges nach der Methode von JUNG u. Mitarb.* ^{13—16, 25}.

Vers.-Gruppe	Substanz	Konzentration d. Emulsionen in %	Tierzahl	„Wirksamkeit“ mit einfachem mittleren Fehler	Beurteilung	Bemerkung
1	A 18*	0,01	38	$0,046 \pm 0,043$	⊖	} Blindversuche
2	A 18* (gealtert)	0,01	18	$0,167 \pm 0,057$	(+)	
3	A 18	0,01	47	$0,18 \pm 0,051$	(+)	
4	A 18	0,01	40	$0,008 \pm 0,029$	⊖	
5	A 18	0,1	40	$0,077 \pm 0,043$	⊖	
6	Chamazulen*	0,01	20	$-0,065 \pm 0,039$	⊖	} Blindversuche
7	Chamazulen	0,1	20	$0,033 \pm 0,051$	⊖	
8	Chamazulen	0,01	40	$-0,093 \pm 0,026$	⊖	
9	Chamazulen	0,1	40	$0,034 \pm 0,05$	⊖	

* Diese Substanzen wurden uns von Herrn Professor JUNG, Berlin, zur Verfügung gestellt.

herein keinerlei Heilwirkung erkennen ließ, zeigte A 18 zunächst in 2 Prüfungen (Versuchsgruppe 2 und 3) einen schwachen entzündungswidrigen Effekt.

In einem Falle handelt es sich um ein gealtertes Präparat von A 18, das uns Herr Professor JUNG zur Verfügung stellte, im anderen Falle um eine frische A 18-Charge, beide synthetisiert von Herrn Dr. ARNOLD. Das letztere Präparat zeigte mit einem Wert von $0,18 \pm 0,051$ die größte überhaupt in unseren Prüfungen beobachtete „Wirksamkeit“: der Wert liegt gerade außerhalb des 3fachen mittleren Fehlerbereiches und besagt, daß der durchschnittliche Gesamt-Heilerfolg des betreffenden Azulens — dem unbehandelten Auge gegenüber — etwa 1,8% beträgt. Eine derartig geringe Wirksamkeit ist unseres Erachtens — vor allem angesichts der großen Fehlerbreite der Versuche — nicht besonders hoch zu bewerten; dies um so weniger, als die Beurteilung der beiden positiven Werte nicht im „Blindversuch“ erfolgt war.

Aus diesem Grunde kontrollierten wir anschließend die Wirksamkeit von A 18 im „Blindversuch“ (Versuchsgruppe 4 und 5). Unter diesen Bedingungen war indes das oben erwähnte Ergebnis nicht mehr reproduzierbar; der geringe Heileffekt muß demnach auf einer subjektiven Täuschung bei der Beurteilung der Entzündungserscheinung beruhen.

Die Wirkungslosigkeit von Chamazulen und A 18 im Ent-

zündungsversuch am Meerschweinchenauge geht auch aus der graphischen Darstellung der sogenannten „täglichen Heilerfolge“ hervor (Abb. 1).

Bei kritischer Betrachtung der Ergebnisse von JUNG und Mitarb. fällt auf, daß auch die von ihnen selbst beobachteten Effekte außerordentlich gering waren. Das Maximum der Wirksamkeit lag bei 5%, zumeist betrugen die „Erfolge“ jedoch nur 2 oder 3%. Um angesichts der großen Fehlerbreite sowie der zahlreichen Irrtumsmöglichkeiten eindeutige qualitative oder gar quantitative Aussagen machen zu können, müßten jedoch schon sehr ausgeprägte Wirkungen vorhanden sein. In den von JUNG mitgeteilten Versuchen ist diese Voraussetzung indes unseres Erachtens nicht gegeben, so daß wir die weitreichenden Schlußfolgerungen dieser Autoren für nicht experimentell begründet halten.

D. Messungen an der strahlenbedingten Entzündung (U.V.) des Kaninchenauges.

Die Ergebnisse unserer bisherigen Versuche standen in so ausgesprochenem Gegensatz zu den eingangs erwähnten Befunden zahlreicher anderer Autoren, daß wir danach streben mußten, sie mit möglichst objektiver Methodik zu sichern. Daher wandten wir uns der Methode von KÜCHLE und LOESER zu.

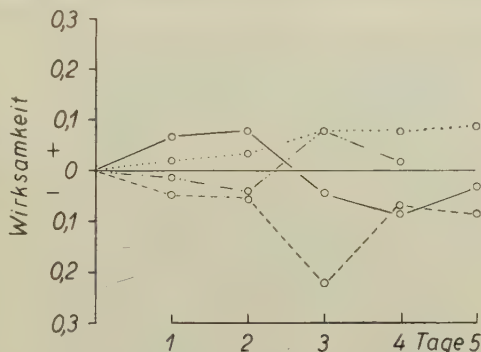


Abb. 1. „Wirksamkeit“ von Azulen A 18 und Chamazulen, getestet an der Senförentzündung von Meerschweinchenaugen (Methode von JUNG u. Mitarb. ^{13-16, 25}).

○—○ Azulen A 18, Versuchsgruppe 4
 ○- - -○ Azulen A 18, Versuchsgruppe 5
 ○—○ Chamazulen, Versuchsgruppe 8, Tabelle 2
 ○- - -○ Chamazulen, Versuchsgruppe 9

1. Zur Versuchstechnik*. Von den Kardinalsymptomen der Entzündung ausgehend versuchten wir zunächst nicht nur die Schwellung (tumor), sondern auch die Entzündungstemperatur (calor) quantitativ messend zu verfolgen.

Zur Bestimmung der Entzündungstemperatur als Kriterium für den Heilverlauf führten wir einen feinen, abgeplatteten Temperaturfühler (Elektrothermometer „Thermorapid“, Fa. Netheler und Hinz, Hamburg-Eppendorf) unterhalb des Oberlides ein. Gleichzeitig maßen wir die Körpertemperatur des Tieres auf rectalem

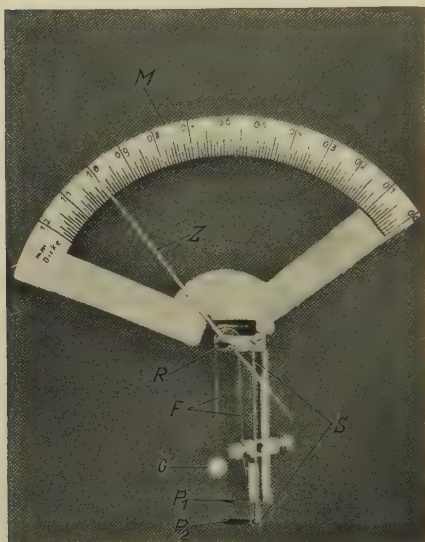


Abb. 2. Meßgerät zur Bestimmung der Liddicke (vgl. Text).

— zumal in Anbetracht der Geringfügigkeit der Temperaturdifferenz zwischen Versuchs- und Kontrollauge — mit dieser Methode eine exakte Auswertungsmöglichkeit nicht gegeben. Aus diesem Grunde beschränkten wir uns in den meisten Versuchen auf die Erfassung der Liddicke.

Bei der Messung des Lidoedems als Ausdruck der entzündlichen Schwellung verwendeten wir ein Meßinstrument, das wir auf der Grundlage des von KÜCHLE und LOESER angegebenen Gerätes für unsere Zielsetzung weiter entwickelt hatten (Abb. 2).

Das Instrument besitzt zwei parallel zueinander stehende Meßplatten (P 1 und P 2), von denen die untere unter das Oberlid geschoben wird. Die obere Platte läuft beweglich in einer Schiene (S) und steht über einem Faden (F), der dreimal um ein Schnurlaufrädchen (R) gewunden ist, mit einem Gegengewicht (G) in Verbindung. Das Schnurlaufrädchen ist über eine gemeinsame Achse mit einem Zeiger (Z) verbunden. Die Meßskala (M) ist entsprechend der Kreisbewegung halbkreisförmig

* Ausführliche methodische Angaben sind der Dissertation von E. FISCHER zu entnehmen.

Wege, um aus der Differenz der Lid- und Körpertemperatur ein Maß für einen etwaigen — lokal bedingten — Temperaturanstieg zu erhalten. Hierbei zeigte sich, daß die Lidtemperatur des normalen Auges um etwa 2°C unterhalb der Rectaltemperatur liegt. Diese Differenz verminderte sich zumeist im Verlauf der Entzündung infolge eines Anstieges der Lidtemperatur und kehrte parallel zum Abklingen des Entzündungsprozesses allmählich wieder zur Ausgangsbasis zurück. Die Differenzverminderung war allerdings häufig nur sehr gering, zumal auch die Körpertemperatur unter dem Einfluß der UV-Bestrahlung gewöhnlich um einige Zehntelgrade anstieg. Besonders störend machte sich jedoch bemerkbar, daß die Meßwerte unter dem Augenlid je nach Lage des Temperaturfühlers große Schwankungen zeigten, so daß die Temperaturmessungen selbst kaum je unter gleichen Bedingungen ablaufen konnten. Daher war

gebogen und so geeicht, daß ein Skalenteil einem Plattenabstand von 0,1 mm entspricht. Das bewegliche System (obere Lidplatte — Zeiger — Gegengewicht) ist derart ausgewuchtet, daß die obere Lidplatte mit möglichst wenig Druck, gerade aber noch aus eigenem Antrieb, auf die untere Platte herabgleitet.

Dieses Gerät besitzt dem Meßinstrument von KÜCHLE und LOESER gegenüber den Vorteil, daß infolge der isotonischen Gegengewichtsanordnung der Druck der oberen Meßplatte auf das zu messende Lidoedem unabhängig von dem Abstand der Meßplatten (also der jeweiligen Liddicke) ist. Damit konnten wir die Möglichkeit einer verschiedenen Kompression des Oedems während der Messung weitgehend ausschalten. Außerdem erlaubt die Parallität der Meßplatten ein exaktes Erfassen der größten Liddicke, wobei die bogenförmige Meßskala die Meßwerte in allen Meßbereichen unverzerrt wiedergibt.

Zur Auslösung der Entzündung wählten wir zunächst die von KÜCHLE und LOESER angegebenen Reizstoffe; allerdings waren diese für unsere Zielsetzung aus verschiedenen Gründen weniger geeignet.

So blieb das Oedem nach Applikation von Allylsenfö in seinem Ausmaß relativ gering. Dabei waren die übrigen Reizerscheinungen so stark, daß die Einführung des Gerätes unter das Oberlid erhebliche Schwierigkeiten bereitete; die Tiere waren hierdurch sehr unruhig, so daß eine exakte Messung erschwert wurde.

Bei Applikation von Essigsäure (2%) kam es zwar zur Auslösung eines harten, isolierten Oberlidoedems; auch die Zunahme der Liddicke war mit Werten zwischen 100—150% innerhalb von 2 Std recht befriedigend. Allerdings klang der Entzündungszustand in relativ kurzer Zeit wieder ab; nach 48 Std war die Schwellung bereits spontan völlig zurückgegangen. Dieser Zeitraum erwies sich jedoch zur Beurteilung einer antiphlogistischen Wirksamkeit als zu kurz, da eine Beschleunigung des Heilverlaufs innerhalb von 2 Tagen von vornherein kaum zu erwarten war. Tatsächlich konnten wir auch in diesem kurzen Zeitraum eine Verminderung des Lidoedems durch Azulenbehandlung nicht beobachten.

Als sehr geeignet für unsere Zielsetzung erwies sich dagegen das Oedem, das sich nach UV-Bestrahlung des Oberlides ausbildet. Es bleibt ohne Behandlung über mehrere Tage annähernd in gleicher Stärke nachweisbar. Außer der Schwellung findet sich eine starke Rötung; die für die Auswertung störende entzündliche Sekretion ist dagegen nur gering. Parallel mit der Abnahme der Lidschwellung gingen diese Entzündungssymptome zurück, so daß die Abnahme der Lidschwellung als ein brauchbares Maß der Abheilungsvorgänge angesehen werden kann.

Methodisch gingen wir dabei folgendermaßen vor: Nach ausreichender Gewöhnung der Kaninchen an einen gut temperierten Versuchsraum (20—24° C) entfernten wir den Tieren mit einer Schere sorgfältig die Haare über den Augenlidern und nahmen anschließend eine Messung der Liddicke vor (Normalwert). Dann wurden die Innenseiten der Oberlider beider Augen je 5 min lang UV-bestrahlt. Zur Bestrahlung verwendeten wir einen Hg-Hochdruckbrenner mit aufgeschnittenem Quarzkolben (1,1 Amp., 50 W, „Osram“). Der Brenner war in einem gefensterten Metallgehäuse untergebracht (Fensterdurchmesser 8 mm), so daß ein Teil der Strahlung ausgeblendet wurde; hierdurch ließ sich auf dem Versuchsobjekt eine konstante Strahlendichte gewährleisten. Während der Bestrahlung betrug der Abstand des Brenners vom Oberlid etwa 3 cm. Augapfel und Nickhaut wurden hierbei vor der Strahlenwirkung bewahrt, da sonst starke Reizerscheinungen die Oedemkontrolle am Oberlid erheblich störten.

Auf diese Weise bestrahlten wir die Oberlider 5mal innerhalb von 2 Tagen (1. Tag 9 und 15 Uhr, 2. Tag 8, 11 und 14 Uhr). Eine Stunde nach der letzten Bestrahlung bestimmten wir durch Messung der Liddicke den Ausgangswert der entzündlichen Reaktion. Sodann verfolgten wir den Entzündungsverlauf durch fortlaufende Messungen, und zwar maßen wir die Liddicke in den ersten 10 Std nach der letzten Bestrahlung in Abständen von 3 Std, an den folgenden Tagen jeweils morgens und abends bis zum Abklingen des Oedems. Etwa 5 Std nach der letzten Bestrahlung war das UV-bedingte Oedem am stärksten entwickelt; es klang dann im Laufe von 6—7 Tagen allmählich ab.

Um ein Maß für die durch die Meßtechnik bedingte Fehlerbreite zu erhalten, führten wir zunächst in enger zeitlicher Folge verschiedene Messungen an ein und demselben Augenlid durch; dies geschah sowohl an unbestrahlten als auch an bestrahlten Augenlidern von je vier Kaninchen. Für jedes Lid wurden 10 Messungen ausgeführt. Um jeglichen subjektiven Einfluß auszuschalten, nahmen wir die Einzelmessungen an einem Tier nicht unmittelbar hintereinander vor, vielmehr wurden die Tiere dem Versuchsleiter in wechselnder Reihenfolge angereicht; so blieb diesem der Vorwert unbekannt. Die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Liddicken lagen für normale Augenlider zwischen 1,9 und 2,3 mm, für die bestrahlten, ödematösen Lider zwischen 3,3 und 4,3 mm. Die mittleren Fehler dieser Mittelwerte lagen am unbestrahlten Lid zwischen 0,86 und 1,5%, am bestrahlten Lid zwischen 1,03 und 2,7% des jeweiligen Mittelwertes. Damit war eine gute Ausgangslage für die geplanten quantitativen Untersuchungen geschaffen.

Um eine unbewußte subjektive Beeinflussung von vornherein auszuschalten, nahmen wir die Prüfung der verschiedenen Azulene ebenfalls im „Blindversuch“ vor; dem Untersucher sollte unbekannt bleiben, welches Auge mit der Testlösung behandelt worden war. Diese Vorsichtsmaßnahme war erforderlich, da wir in Vorversuchen beobachten konnten, daß sich trotz des weitgehend objektiven Meßverfahrens subjektiv bedingte Fehler einschleichen können.

Bei diesen „Blindversuchen“ war es — der Blaufärbung der öligen Azulenlösungen wegen — erforderlich, auch die Kontrollösungen bis zur Farbgleichheit anzufärben. Hierfür wählten wir einen Zusatz von 0,055% Bromindigo. Eine Unterscheidung von Test- und Kontrollösung war dann praktisch ausgeschlossen. Der Farbzusatz selbst hatte keinen Einfluß auf den Ablauf der Entzündung. Bei Prüfung der Azulenemulsionen und alkoholischen Kamillenextrakten erübrigte sich eine Anfärbung der Kontrollösung.

Die therapeutische Behandlung führten wir nach folgendem Plan durch: Eine Stunde nach der letzten UV-Bestrahlung und nach vollzogener Messung der Liddicke (also um 14—15 Uhr des zweiten Bestrahlungstages) wurden die Test- und Kontrollösungen 10 Std lang alle 15 min in den Conjunctivalsack unter die bestrahlten Oberlider eingeträufelt (je 2 Tropfen). Nach jeder Träufelung zogen wir den Conjunctivalsack etwa 30 sec lang bei zur Seite geneigtem Kopf auseinander, um ein rasches Auslaufen der Lösungen zu verhindern. So standen die entzündeten Augen während eines Zeitraumes von 10 Stunden praktisch ununterbrochen unter der Einwirkung der Präparate. Am normalen, nicht entzündeten Auge wurde diese Behandlung reaktionslos getragen.

Zur Austestung der verschiedenen Wirkstoffe bildeten wir Versuchsgruppen von mindestens 6 Tieren. Innerhalb einer Versuchsgruppe berechneten wir dann aus den jeweiligen Meßwerten der behandelten und unbehandelten Augen die

arithmetischen Mittelwerte und trugen diese in Abhängigkeit von der Zeit der Messung in ein Koordinatensystem ein (vgl. Abb. 3—7). Durch eine derartige graphische Darstellung ließ sich — bei Verwendung der Liddicke als Kriterium — ein anschauliches Bild über den Ablauf der Entzündungserscheinungen gewinnen. Zur statistischen Erfassung eines etwaigen Heilerfolges berechneten wir außerdem innerhalb einer Gruppe bei jeder Messung die Differenz zwischen dem jeweiligen Mittelwert der behandelten und unbehandelten Augenlider. Aus den Differenzen aller Messungen innerhalb einer Gruppe — ausgedrückt in Prozent des unbehandelten Lidwertes — bestimmten wir dann nach Beendigung des Versuches das arithmetische Mittel und den zugehörigen mittleren Fehler: Der so erhaltene Wert gibt — ähnlich wie bei dem Auswertungsverfahren von JUNG — ein anschauliches Maß für die „Wirksamkeit“ eines Präparates, da er einen Ausdruck des durchschnittlichen Gesamt-Heilerfolges in der betreffenden Gruppe darstellt.

2. *Ergebnisse.* Die wesentlichen Auswertungsergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt; einzelne Daten sind in den Abb. 3—6 graphisch näher erläutert.

Tabelle 3. *Ergebnisse der Untersuchungen mit Chamazulen, Azulen A 18, Guajazulen und alkoholischem Kamillenextrakt an der strahlenbedingten Entzündung (UV) des Kaninchenauges.*

Vers.- Gruppe	Substanz	Konzentration in % und Zubereitungsform	„Wirksamkeit“ in % mit einfachem mittleren Fehler
1	Kontrolle, unbehandelt	—	2 ± 0,74
2	Kontrolle, Aqua dest.	—	0,67 ± 0,51
3	Chamazulen	0,1 Olivenöl	—0,5
4	A 18	0,1 Ultraschall-emulsion	1,5 ± 1,1
5	A 18	0,1 Olivenöl	3,5 ± 0,78
6	A 18	0,1 Olivenöl	—1,2
7	A 18*	0,1 Olivenöl	—1,1
8	Guajazulen	1 Olivenöl	2,9 ± 1,1
9	Alkoh. Kamillen-Extrakt	1 g Flor.Cham./ml Olivenöl	—2,2

* In diesem Versuch wurde die Azulenbehandlung 1½ Std vor der UV-Bestrahlung begonnen und über die gesamte Versuchsdauer fortgeführt.

In der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 3 [Versuchsgruppe 1]) traten nennenswerte Unterschiede im Heilverlauf der UV-bedingten Augenentzündung nicht auf. Ein ganz analoges Ergebnis erhielten wir auch in einem weiteren Kontrollversuch (Versuchsgruppe 2) bei Träufelung mit Aqua dest.

Damit war eine bessere Ausgangslage erreicht als bei den bisher geschilderten Methoden der Entzündungsauslösung. Dies liegt nicht zuletzt daran, daß der Strahlenreiz unter unseren Versuchsbedingungen mit hoher Gleichartigkeit und unter voller experimenteller Kontrolle appliziert werden konnte, während dies naturgemäß für das Einträufeln einer Reizsubstanz nicht gilt (Wischen, Tränensekretion usw.).

Die Abb. 4 und 5 erläutern die Ergebnisse der Versuchsgruppen 3 (Chamazulen) und 4 (A 18). Die experimentellen Daten sowie die graphischen Darstellungen beweisen, daß eine antiphlogistische Wirkung der verwendeten Testlösungen nicht vorhanden ist. Trotz Variation der Konzentration und der Anwendungsform änderte sich dieses Ergebnis auch in weiteren Versuchen nicht. In gleicher Weise war Guajazulen wirkungslos (Versuchsgruppe 8), das in der neueren Literatur besondere Beachtung fand ^{7, 27*}.

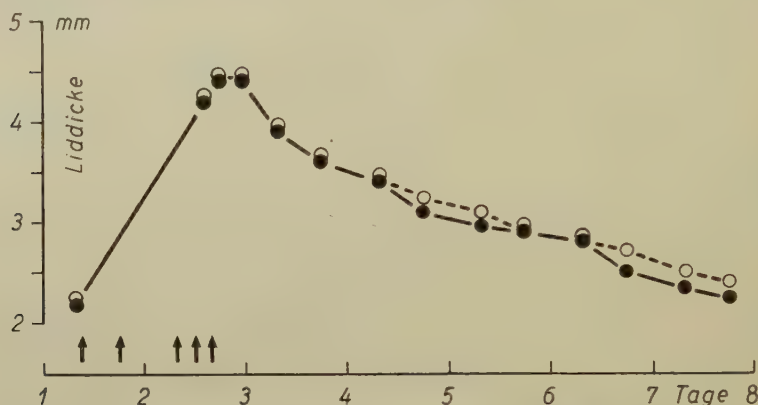


Abb. 3. Kontrollversuche (beide Augen unbehandelt). Versuchsgruppe 1, Tab. 3.

Abb. 3—6. Wirkung von Chamazulen und Azulen A 18 auf die Strahlenconjunctivitis (UV) des Oberlides von Kaninchen. Ordinate: Liddicke in Millimetern. Abszisse: Zeit in Tagen.

- --- ○ Liddicke des unbehandelten Auges.
- --- ● Liddicke des mit Azulen behandelten Auges.
- ↑ = UV-Bestrahlung.

Jeder Kurvenpunkt wurde aus den Mittelwerten von 6 Tieren errechnet. Die schraffierte Fläche stellt den Zeitraum der Azulenbehandlung dar.

Um zu prüfen, ob der Zeitpunkt und die Dauer der Azulenapplikation für das Zustandekommen einer antiphlogistischen Wirkung von Bedeutung ist, führten wir in einer weiteren Versuchsgruppe eine kombinierte — prophylaktische und kurative — Azulenbehandlung durch. Hierbei wurde mit der Azulen-Träufelung bereits $1\frac{1}{2}$ Std vor der ersten UV-Bestrahlung begonnen; sie wurde dann alle 15 min — nicht nur während der üblichen Bestrahlungs- und Behandlungsperiode, sondern über die gesamte Versuchsdauer — fortgeführt.

* So berichteten SCHIMERT und SCHWARZ kürzlich über eine ausgeprägte „reparative, entzündungsabkürzende“ Wirksamkeit des Guajazulens bei Hautnekrosen (Meerschweinchen), die durch subcutane Injektion einer 20%igen Calciumchlorid- bzw. 10%igen Formalinlösung hervorgerufen wurden. In eigenen umfassenden Versuchen, in denen wir Ausbildung und Abheilung der Geschwüre planimetrisch verfolgten, ließen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Hierüber wird andernorts ausführlich berichtet.

Wie Tab. 3 (Versuchsgruppe 7) sowie Abb. 6 zeigen, war indes auch mit dieser Methode eine entzündungswidrige Wirksamkeit des Azulens A 18 nicht festzustellen.

Diese Ergebnisse stehen in völliger Übereinstimmung mit unseren Resultaten an der Senfölenzündung des Kaninchen- und Meerschweinchenauges; sie führen zu der eindeutigen Feststellung, daß ein Heilerfolg

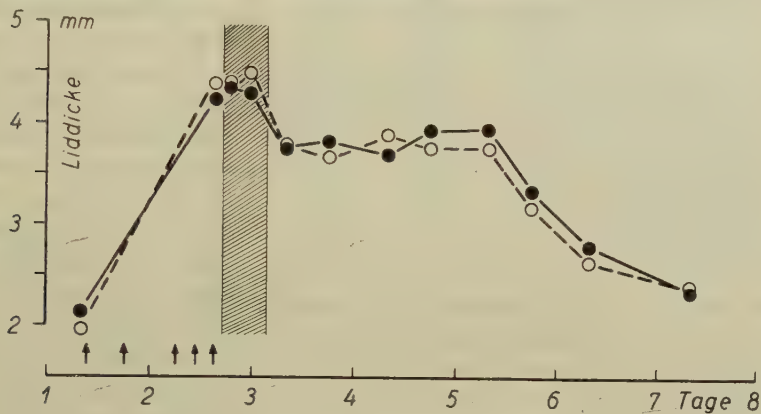


Abb. 4. Chamazulen, Versuchsgruppe 3, Tab. 3.

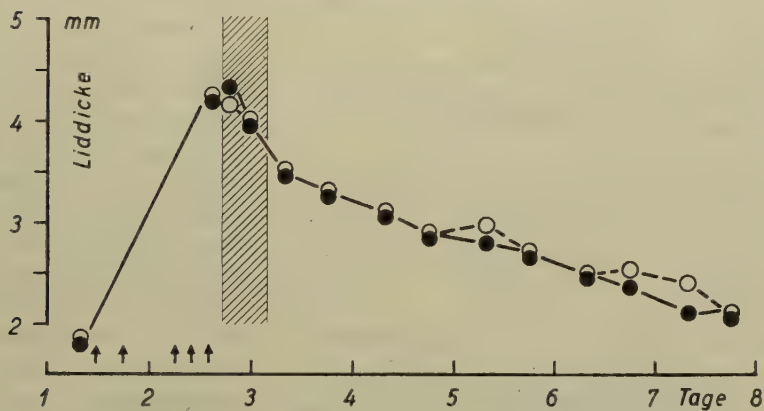


Abb. 5. Azulen A 18, Versuchsgruppe 4, Tab. 3.

auf diesem Wege weder mit natürlichen und synthetischen Azulenen noch mit einem alkoholischen Extrakt aus Flores Chamomillae zu erzielen ist. Bei keiner dieser Substanzen und Zubereitungen ist unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine antiphlogistische Wirkung nachweisbar.

Ansichts der negativen Ergebnisse der bisherigen therapeutischen Versuche mit Azulen stellten wir uns die Frage, ob die verwendeten Tests überhaupt den Nachweis einer antiphlogistischen Wirkung gestatten.

Für die *Senfö*-Entzündung des Kaninchenauges ist diese Voraussetzung bereits durch die alten Untersuchungen von CHIARI und Mitarb. unter Verwendung von Calcium als Antiphlogisticum geklärt. So erschien

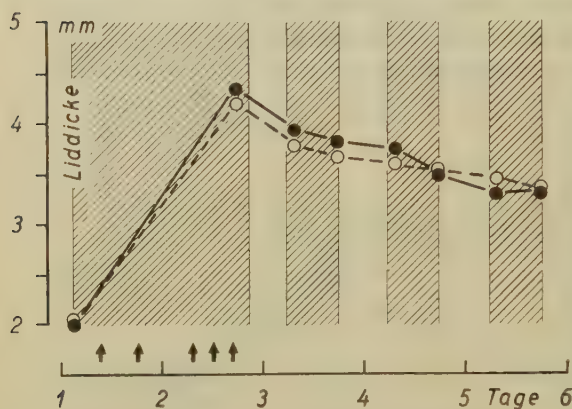


Abb. 6. Azulen A 18 (prophylaktische und kurative Behandlung), Versuchsgruppe 7, Tab. 3.

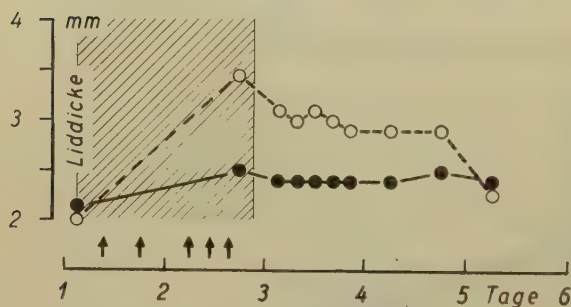


Abb. 7. Wirkung von Calciumchlorid (50 mg/kg i.m., 6mal täglich) auf die Strahlenconjunctivitis von Kaninchen.

○---○ Liddicke der Kontrolltiere.

●---● Liddicke der mit Calcium behandelten Tiere.

↑ = UV-Bestrahlung.

Jeder Kurvenpunkt wurde aus den Mittelwerten von 4 Tieren errechnet. Die schraffierte Fläche stellt den Zeitraum der Calciumbehandlung dar.

es zweckmäßig, analoge Versuche mit Calcium auch an der UV-bedingten Augenentzündung durchzuführen.

Die Applikation von Calcium erfolgte in Anlehnung an die Methode von CHIARI und Mitarb. über die gesamte zweitägige Bestrahlungsperiode (Calciumchlorid, 50mg/kg, intramuskulär, 6mal täglich). Wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, war eine ausgeprägte Schutzwirkung gegenüber der Strahlenschädigung im Vergleich zu einer Kontrollösung (0,9% ige NaCl-Lösung i.m.) zu beobachten. Die Entzündungserscheinungen blieben unter Calciumbehandlung weit hinter denen der Kontrolltiere zurück; eine Lidschwellung trat, wie die Meßwerte in Abb. 7 zeigen, praktisch gar nicht in Erscheinung.

Damit ist also der Nachweis geführt, daß

auch die strahlenbedingte Entzündung einer geeigneten antiphlogistischen Behandlung zugänglich ist; die Brauchbarkeit des Tests als solchem ist damit bewiesen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Methoden, mit denen bislang in der Literatur der Nachweis der antiphlogistischen Wirksamkeit von Azulen und Kamillenzubereitungen geführt wurde (lokale Behandlung einer Senföentzündung am Kaninchen-

und Meerschweinchenauge), waren Subjektivmethoden. Diese sind von vornherein mit größeren Fehlern belastet und dem Irrtum unterworfen. Bei ihrer Überprüfung versuchten wir diesen Nachteil durch Einsatz großer Versuchs- und Kontrollgruppen sowie durch Beurteilung der Effekte im „Blindversuch“ zu verringern. Unter diesen Voraussetzungen ließen sich die Befunde der Literatur nicht bestätigen: eine lokale antiphlogistische Wirksamkeit der Azulene und alkoholischen Kamillensextrakte war nicht zu beobachten.

Zur Sicherung dieser negativen Ergebnisse unternahmen wir — unter Anwendung eines objektiven Meßverfahrens — quantitative Versuche an der UV-bedingten Entzündung des Kaninchenauges. Auch an diesem Test waren die geprüften Azulene und Kamillenzubereitungen wirkungslos.

Auf Grund unserer negativen Ergebnisse sind alle theoretischen Erörterungen über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und antiphlogistischer Wirkung von Azulenen sowie über die Wirksamkeit bestimmter Zustandsformen (Alterung) gegenstandslos. Auch die Anschauung über die Bedeutung der Azulene als das wesentliche antiphlogistische Prinzip der Kamille läßt sich nicht mehr aufrecht erhalten, zumal — wie HEUBNER neuerdings selbst betonte — im Kamillen-Aufguß nur eine farblose Azulenvorstufe in sehr geringer Konzentration und nicht das Azulen selbst enthalten ist⁸.

Angesichts des Versagens der Azulene im Tierversuch (vgl. auch¹⁸) sollte es ratsam erscheinen, die klinischen Beobachtungen und Befunde bei der Therapie mit Azulenen im Sinne MARTINIS mit besonderer Kritik erneut zu überprüfen und nach allen Richtungen hin abzustützen, dies um so mehr, als die Unsicherheiten und Fehlermöglichkeiten der *klinischen* Beurteilung nicht geringer, sondern größer sind als im Tierexperiment. Die bewährte therapeutische Anwendung von Kamillenaufgüssen, an der wohl verschiedenartige Wirkungsprinzipien beteiligt sind, bleibt dagegen von diesen Ergebnissen unberührt.

Zusammenfassung.

Bei experimentellen Arbeiten auf dem Azulengebiet zeigte sich, daß die bislang gebräuchlichen Testmethoden (Senfölentzündung am Kaninchen- bzw. Meerschweinchenauge) mit einer großen Streuung belastet sind. Schon der unbeeinflusste Entzündungsablauf wies eine außergewöhnlich große Fehlerbreite auf, die sich um so nachteiliger auswirkte, als die Beurteilung des Entzündungsablaufs nicht auf Grund von *Messungen*, sondern von *subjektiven Eindrücken* erfolgt.

Im Gegensatz hierzu bot die strahlenbedingte Augenentzündung (UV-Bestrahlung) ein wesentlich gleichförmigeres Bild. Durch *Messung* der Liddicke war hier eine *objektive Beurteilung* und eine quantitative Auswertung des Entzündungsgrades möglich. In Versuchen mit thera-

peutischer Calciumbehandlung konnte die Brauchbarkeit des Tests zum Nachweis einer entzündungswidrigen Wirksamkeit sichergestellt werden.

Unter Einsatz großer Tierzahlen und Bewertung der Ergebnisse im Blindversuch wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1. Chamazulen, A 18 (1-Isopropyl-5-methyl-azulen) und Kamillenöl sind bei lokaler Anwendung an der Senfölentzündung des Kaninchenauges (Methode nach HEUBNER, GRABE; ALBATH; POMMER) ohne Wirkung.

2. Chamazulen und A 18 zeigten auch an der Senfölentzündung des Meerschweinenauges (Methode nach JUNG und Mitarb.) keinerlei therapeutische Effekte.

3. Ebenso ließen Chamazulen, A 18, Guajazulen und Kamillenöl an der strahlenbedingten Augenentzündung von Kaninchen jeglichen Einfluß vermissen.

4. Azulen kann als das antiphlogistische Wirkungsprinzip von Kamillenzubereitungen nicht mehr anerkannt werden. Die bisherigen Theorien über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und antiphlogistischer Wirksamkeit der Azulene müssen aufgegeben werden.

Fräulein G. NEHER, Herrn H. BARTLING, A. CAPPEL, E. FISCHER und K. MEIER danken wir herzlich für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen.

Literatur.

- ¹ ARNOLD, H., F. JUNG, R. REUBER u. W. SPIELMANN: *Pharmazie* **4**, 220 (1949). — ² BRÜHL, W.: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, **11**. — ³ CHIARI, R., u. H. JANUSCHKE: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **65**, 120 (1911). — ⁴ EICHHOLTZ, F.: *Lehrbuch der Pharmakologie*. 7. Aufl., Springer-Verlag 1951. — ⁵ FISCHER, E.: *Diss.* Göttingen 1954. — ⁶ HELLRIEGEL, W., u. W. KEUDEL: *Strahlenther.* **82**, 253 (1950). — ⁷ HERZ, A.: *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 253 (1953). — ⁸ HEUBNER, W.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **222**, 231 (1954). — ⁹ HEUBNER, W., u. W. ALBATH: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **192**, 383 (1939). — ¹⁰ HEUBNER, W., u. F. GRABE: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **171**, 329 (1933). — ¹¹ JANISTYN, H.: *Parfümerie u. Kosmetik* **32**, 3/4 (1951). — ¹² JARETZKY, R., und F. NEUWALD: *Arch. Pharmaz.* **277**, 50 (1939). — ¹³ JUNG, F., H. ARNOLD, W. SCHOETENSACK u. G. BRUNO: *Klin. Wschr.* **1949**, 511. — ¹⁴ JUNG, F., u. W. SCHOETENSACK: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **212**, 112 (1950). — ¹⁵ JUNG, F., W. SCHOETENSACK u. G. BRUNO: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 1 (1951). — ¹⁶ JUNG, F., W. SCHOETENSACK, E. MAHLER u. L. BURCKHARD: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 255 (1951). — ¹⁷ KOHLSTAEDT, E., E. STAAB u. W. KESPER: *Pharmazie* **1**, 218 (1946). — ¹⁸ KOLLMANNSPERGER, G., u. H. OETTEL: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **222**, 228 (1954). — ¹⁹ KÜCHLE, H. J., u. A. LOESER: *Z. exper. Med.* **117**, 369 (1951). — ²⁰ MARTINI, P.: *Methodenlehre der therapeutisch-klinischen Forschung*. Springer-Verlag 1953. — ²¹ NEUWALD, F.: *Pharmaz. Ztg.* **84**, 475 (1948). — ²² NEUWALD, F.: *Süddtsch. Apoth.-Ztg.* **88**, 362 (1948). — ²³ POMMER, C.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **199**, 74 (1942). — ²⁴ POMMER, H.: *Angew. Chem.* **62**, 281 (1950). — ²⁵ REINECKE, M., H. BARTON u. F. JUNG: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **215**, 579 (1952). — ²⁶ ROECKE-RATH, W.: *Strahlenther.* **82**, 253 (1950). — ²⁷ SCHIMERT, G., u. K. SCHWARZ: *Ärztli. Forsch.* **8**, I/85 (1954). — ²⁸ ZIERZ, P., u. W. KIESSLING: *Dtsch. med. Wschr.* **1953**, 1166.

Professor Dr. NORBERT BROCK, Pharmacol. Abtlg. d. Asta-Werke AG.,
Chemische Fabrik, Brackwede i. W.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Padua
(Direktor: Prof. Dr. E. MENEGHETTI).

Quantitative Veränderungen in den Nucleotiden einiger Organe des Meerschweinchens unter Wirkung des Adenosintriphosphats (ATP).

Von
ADOLFO PORRO.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Juni 1954.)

Das Adenosintriphosphat (ATP), das Adenosindiphosphat (ADP) und das Adenosinmonophosphat (AMP) spielen eine äußerst wichtige Rolle in der Biologie und in der Physiologie der Zelle: ihre hauptsächliche Funktion besteht in der Phosphorylierung, in der Teilnahme an der Bildung und an der Wirkung der Cofermente, in der Teilnahme am Stoffwechsel der Muskeln, der Fette, der Kohlenhydrate und einiger Vitamine und an der Oxy-Reduktion^{2, 3}.

Vor kurzem haben ALBAUM u. Mitarb.¹ bewiesen, daß das AMP in starken Dosen bei der Ratte eine Veränderung des Gehalts an Nucleotiden in den verschiedenen Geweben hervorruft: ATP stieg vor allem im Gehirn, in den Muskeln, im Herz und in der Leber an. In Leber und Blut erfolgte gleichzeitig auch ein Anstieg der Totalpurine (PT), während in der Niere der Gehalt an Nucleotiden weder qualitative noch quantitative Veränderungen erfuhr. Unser Interesse lenkte sich auf die Veränderungen, die das ATP im Gehalt an PT, ATP, ADP und AMP einiger Organe des Meerschweinchens hervorruft.

Methodik.

Es wurden Meerschweinchen von etwa 500 g verwendet. Eine Gruppe von 20 Tieren diente zur Bestimmung der Kontrollmenge der verschiedenen Nucleotide (PT, ATP, ADP, AMP) im Blut, im Herzen, im Gehirn, in der Leber, in der Milz, in der Lunge und in der Niere.

Eine andere Gruppe von 60 Tieren wurde je 40, 90 und 180 min nach subcutaner Injektion von 300 mg/kg ATP (in Form des Natriumsalzes der Firma Vister) getötet.

Zu diesem Zweck und für die Präparation der Organe wurde die Methode von ALBAUM und Mitarb.¹ angewendet. Die Dosierung des ATP, ADP, AMP erfolgte nach der Enzymmethode KALCKARS^{5, 6}.

Die Totalpurine (PT) wurden mit dem BECKMANNschen Spektrophotometer Modell DU bei 260 m μ bestimmt und als Adenin berechnet.

Die Unterschiede, die sich aus den Kontrollwerten und denen der behandelten Tiere ergaben, wurden nach der Formel der „Statistical Error difference“ gewertet⁷.

Ergebnisse.

Die Werte für die den Veränderungen an Nucleotiden in den in Betracht gezogenen Organen nach subcutaner Einführung von 300 mg/kg ATP sind auf dem Diagramm wiedergegeben.

Man sieht, daß im allgemeinen der Verlauf der Konzentration an PT, ATP und ADP sowohl im Blute als auch in der Niere fast der gleiche

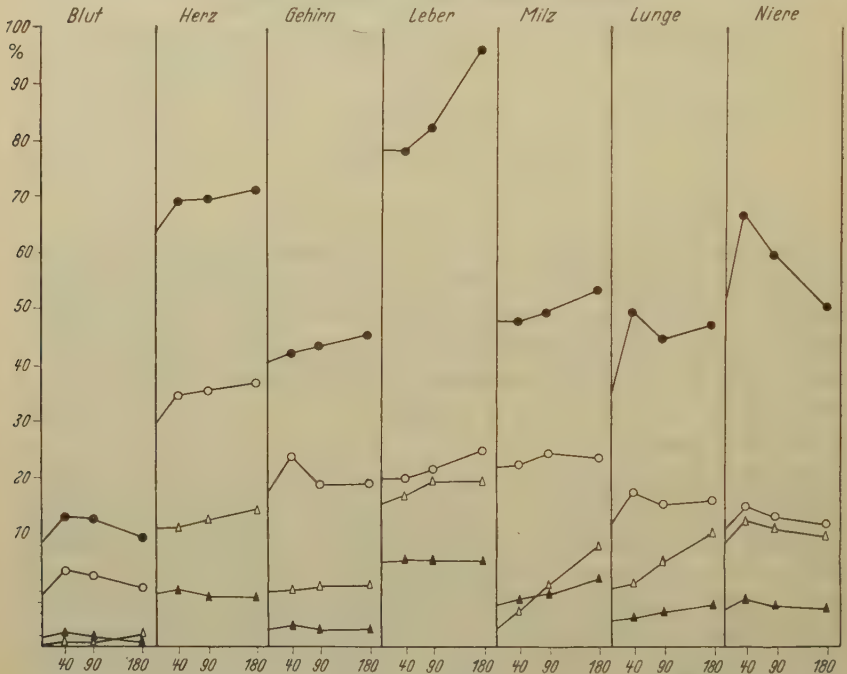


Abb. 1. Veränderungen im Nucleotidgehalt einiger Organe des Meerschweinchens infolge Einfluß von 300 mg/kg ATP. Ordinate: Milligramm ausgedrückt als Adenin berechnet. Abszisse: Zeit in Minuten. • Totalpurine; ○ Adenosintriphosphat; ▲ Adenosindiphosphat; △ Adenosinmonophosphat.

ist: nach einem raschen Anstieg, der ungefähr nach 40 min seinen Höhepunkt erreicht, kehren diese 3 Fraktionen wieder auf ihr normales Niveau zurück. Das AMP macht eine geringfügige Ausnahme, indem seine Konzentration im Blut erhöht bleibt, während die der Niere schon auf die normale Höhe abgefallen ist. Gleichzeitig bleibt der Gehalt an PT in allen anderen Organen hoch. Dieser Gehalt steigt für das Herz und die Lunge sofort rasch an, weniger rasch für die Leber, die Milz und das Gehirn.

Das ATP ergibt dieselben Veränderungen wie PT im Herzen, in der Leber und Lunge, während es im Gehirn und in der Milz nach 90 min abfällt. Das ADP erfährt in allen Organen nur geringe Veränderungen;

nur die Milz, in welcher es zunimmt, bildet eine Ausnahme. Der Gehalt an AMP steigt in der Milz und in der Lunge rasch an, während das Herz und die Leber ein gewisses Ansammlungsvermögen zeigen.

Zusammenfassend können wir sagen, daß subcutane Dosen von 300 mg/kg ATP, am Meerschweinchen je nach den verschiedenen Organen, wechselvolle Veränderungen im Gehalt an Nucleotiden hervorrufen. Nimmt man als Vergleichswert den der Rückkehr des Blutes auf seinen Ausgangswert, so verhält sich die Niere in gleicher Weise, während das Herz eine höhere Konzentration an PT, ATP und AMP, das Gehirn an PT und ATP, die Leber an PT, ATP und AMP, die Milz an PT, ADP und AMP und die Lunge an PT, ATP, ADP und AMP aufweist.

Schlußfolgerungen.

Das subcutan eingeführte ATP geht rasch in das Blut über und nach 3 Std kann seine Resorption als vollkommen angesehen werden. Die verschiedenen Organe verhalten sich ihm gegenüber je nach ihrer Fähigkeit, die Molekülstruktur des Nucleotids zu verändern. In der Tat ist bekannt, daß die Niere wie die Leber in großem Ausmaß desaminiert und dephosphoryliert, während die Milz nur desaminiert und wenig dephosphoryliert; der Muskel desaminiert und dephosphoryliert nur die freien Nucleotide⁴.

Auf Grund unserer Untersuchungen konnten wir feststellen, daß die Niere das ATP rasch spaltet, so daß der Gehalt an Nucleotiden sowie der des Blutes zur Norm zurückkehrt, während die Leber sehr viel PT anspeichert. Die Milz hält wegen ihrer geringen Dephosphorylierungsfähigkeit die Mono- und Di-Phosphate zurück.

Wenn wir bedenken, daß der Muskel nur die freien Nucleotide spaltet, können wir, auch auf die Ergebnisse unserer Experimente mit dem Herzen gestützt, annehmen, daß das ATP sofort gebunden wird; das würde vielleicht auch erklären, warum hier noch ein hoher Grad an ATP besteht, während im Blut schon jeder Überschuß ausgeschieden ist.

Denselben Kriterien folgend können wir hinzufügen, daß das Gehirn rasch dephosphoryliert, während die Lunge diese Fähigkeit nur in geringem Ausmaß besitzt.

Zusammenfassung.

Am Meerschweinchen erfährt subcutan eingespritztes ATP eine rasche und vollkommene Resorption.

Die Bestimmung des ATP und seiner dephosphorylierten Abkömmlinge (ADP, AMP) sowie der Totalpurine im Blut, im Herzen, im Gehirn, in der Leber, in der Milz, in der Lunge und in der Niere zu verschiedenen Zeiten ergibt eine erhebliche und in den einzelnen Organen verschiedene

Veränderung des Gehalts an Nucleotiden. Diese ungleiche Verteilung hängt wahrscheinlich vom Desaminierungs- und Dephosphorylierungsvermögen der in Betracht gezogenen Organe ab.

Literatur.

¹ ALBAUM, H. G., D. PANKIN and E. K. HARVILL: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 529 (1953). — ² DUBOIS-FERRIÈRE, H.: Helvet. Med. Acta **18**, 84 (1951). — ³ DUBOIS-FERRIÈRE, H.: Helvet. Med. Acta **18**, 192 (1951). — ⁴ GREENSTEIN, J. P., C. E. CARTER and H. W. CHALKE: Cold. Spring Harbor Symp. Quart. Biol. **12**, 64 (1947). — ⁵ KALCKAR, H. M.: J. of Biol. Chem. **167**, 445 (1947). — ⁶ KALCKAR, H. M.: J. of Biol. Chem. **167**, 461 (1947). — ⁷ MAILAND, D.: Elementary Medical Statistics, p. 178. W. B. Saunders Company (1952).

Dr. ADOLFO PORRO, Istituto di Farmacologia della Università di Padova (Italia),
Via Loredan n. 2.

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. SCHOEN).

Zur antithyreoidalen Wirkung von Kaliumperchlorat.

Von

HANS-LUDWIG KRÜSKEMPER und HANS KLEINSORG.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juni 1954.)

Anlaß zu den vorliegenden Untersuchungen waren Befunde von WYNGAARDEN u. Mitarb. (1952, 1953), die bei der Prüfung verschiedener Anionen hinsichtlich der Beeinflussung der Jodspeicherung durch die Schilddrüse fanden, daß vornehmlich das Perchloration eine beträchtliche Verminderung der J^{131} -Aufnahme bewirkt.

Da eine große Anzahl der heute gebräuchlichen antithyreoidalen Medikamente nicht selten toxische Nebenwirkungen zeigt und da andererseits das Perchloration im Gegensatz zum Chloration keine Methämoglobinbildung verursacht, schien eine nähere tierexperimentelle Analyse der antithyreoidalen Wirkung des Perchlorats angezeigt, mit dem Ziel, Grundlagen für eine eventuelle therapeutische Anwendung beim Menschen zu gewinnen.

Um einen genaueren Aufschluß über die Wirkungsweise des Perchlorats zu erhalten, wurden im einzelnen folgende Größen bestimmt: das Schilddrüsengewicht, die Gewebsatmung (Leber), das Verhalten von Leberfermenten (alkalischer Phosphatase, Cholin oxydase) und die Wirkung des Kaliumperchlorats auf die Gewebsatmung *in vitro*. Außerdem wurde geprüft, ob das Perchlorat in der Lage ist, Thyroxineffekte in der Körperperipherie zu beeinflussen, da von verschiedenen Autoren eine solche Wirkung für andere antithyreoidale Mittel angenommen wird (ABELIN, 1947; ANDIK u. Mitarb., 1949).

Schließlich wurde an hypophysektomierten Ratten die Frage untersucht, ob die antithyreoidale Wirkung des Perchlorats über die Hypophyse zustande kommt oder aber auf eine Beeinflussung der Thyroxinsynthese zurückzuführen ist.

Abgesehen von den eingangs zitierten Veröffentlichungen ist relativ wenig über Pharmakologie und Toxikologie des Perchloration bekannt (vgl. EICHLER, 1950). Daher wurden neben dem Allgemeinverhalten das Körpergewicht und das Blutbild der Versuchstiere kontrolliert.

Methodik.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt an 125 männlichen, weißen Inzuchtratten mit einem Gewicht zwischen 100 und 130 g, die bei einer Standardkost (nach F. BAHNER, Hersteller: Fa. Latz, Euskirchen) gehalten wurden. Die im Versuch befindlichen Tiere wurden in zweitägigen Abständen vor der Fütterung gewogen (Genauigkeit ± 1 g). Die Normaltiere erhielten als Trinkflüssigkeit Wasser, die hypophysektomierten Tiere¹ 5%-Glucoselösung ad libitum.

Das *Kaliumperchlorat* (Merck, p. a.) wurde mit täglich zweimaliger Schlundsondenfütterung einer wäßrigen Lösung (um 7,30 Uhr und um 19,30 Uhr) in einer Gesamttagesdosis von 100 mg bzw. 250 mg/kg Ratte gegeben. In gleicher Weise geschah die Applikation von Methylthiouracil (Merck) (0,5%ige Suspension in Wasser; Gesamttagesdosis 100 mg/kg Ratte). In jedem Fall erhielten die Tiere bei der Verabfolgung der Substanzen diese in 1 ml H₂O/100 g Körpergewicht.

Das *Thyroxin* (Roche) wurde täglich einmal subcutan injiziert (0,3 mg/100 g Ratte), ebenso das *thyreotrope Hormon* (Pretiron Schering²) in einer Dosierung von 15 bzw. 30 MSE/Tier täglich.

Die *Blutentnahme* zur Bestimmung der Leuko- und Erythrocytenzahl bzw. zur Anfertigung des Blutausrichs erfolgte nach Coupierung des Schwanzes aus der Schwanzvene.

Die Tiere wurden durch Herschnitt *getötet* (letzte Fütterung 24 Std vor der Tötung; Flüssigkeit ad libitum). Sofort nach der Tötung wurden Schilddrüse und Nebennieren präpariert und frisch gewogen (Genauigkeit $\pm 0,2$ mg). Bei den hypophysektomierten Tieren wurde autopsisch die Vollständigkeit der Hypophysektomie kontrolliert. Außerdem diente die Konstanz des Körpergewichts während des Versuchszeitraumes als Kriterium der totalen Hypophysektomie.

Die *Gewebsatmung* wurde an Leberschnitten manometrisch gemessen (VersuchsmEDIUM: RINGER-Lösung mit 0,2% Glucose und 0,15 m-Phosphatpuffer pH 7,2). Trockengewicht 10—20 mg/Ansatz.

Die Aktivität der *Cholinorydase* wurde nach KRÜSKEMPER und DIRSCHERL (1953) im Leberhomogenat [hergestellt im Glashomogenisator von POTER und ELVEHJEM (1936)] gemessen: VersuchsmEDIUM: RINGER-Phosphatlösung, Verhältnis 4: 1; Phosphatpuffer 0,15 m; pH 7,6. Aktivitätsangabe als $Q_{O_2}^{Cholin}$ (Sauerstoffverbrauch in mm³/mg Trockengewebe/60 min, nach Abzug des Wertes für die Grundatmung).

Die Aktivität der *alkalischen Leberphosphatase* wurde ebenfalls im Homogenat bestimmt. Methodik siehe KIRBERGER und MARTIN (1950). Aktivitätsangabe in KING-ARMSTRONG-Einheiten/10 mg Trockengewebe.

Die *statistische Auswertung* der Ergebnisse geschah nach der Methode von PÄTAU (1943). Angegeben wird jeweils die Wahrscheinlichkeit p für die Homogenität der verglichenen Werte ($p = > 0,05$: nicht signifikant; $p = 0,05 - 0,01$ *: schwach signifikant; $p = 0,01 - 0,001$ ** : signifikant; $p = < 0,001$ ***: hochsignifikant).

Die folgende Aufstellung gibt eine Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen. Sie berücksichtigt die Verabfolgung (Zeitraum und Dosierung) der einzelnen Substanzen. Die Gruppenbezeichnungen kommen in Text, Abbildungen und Tabellen zur Anwendung:

¹ Für die Überlassung der hypophysektomierten Ratten sind wir den Farbwerken Hoechst sehr zu Dank verpflichtet.

² Der Schering AG., Berlin-West, danken wir für das verwendete Pretiron.

K: unbehandelte Normaltiere.

A₁: KClO₄ 100 mg/kg; 7 Tage.

A₂: KClO₄ 100 mg/kg; 14 Tage.

A₃: KClO₄ 100 mg/kg; 21 Tage.

A₄: KClO₄ 100 mg/kg; 28 Tage.

A₅: KClO₄ 100 mg/kg; 28 Tage, anschließend 14 Tage ohne Behandlung.

A₆: KClO₄ 250 mg/kg; 7 Tage.

A₇: KClO₄ 250 mg/kg; 14 Tage.

B: Methylthiouracil (MTU) 100 mg/kg; 14 Tage.

C₁: Thyroxin 0,3 mg/100 g; 11 Tage.

C₂: Thyroxin 0,3 mg/100 g; KClO₄ 100 mg/kg; 11 Tage.

D₁: Hypophysektomierte Tiere, unbehandelt.

D₂: „ „ „, Pretiron (15 MSE/7 Tg.; dann 30 MSE/Tier/3 Tg.).

D₃: „ „ „, Pretiron (siehe D₂); KClO₄ 250 mg/kg 10 Tage.

D₄: „ „ „, KClO₄ 250 mg/kg; 10 Tage.

Ergebnisse.

1. *Allgemeinwirkungen des Kaliumperchlorats.* Abgesehen von einer von Dosis und Dauer der Verabfolgung des Kaliumperchlorats abhängigen Abnahme der Spontanität der Versuchstiere ergab sich bei täglich mehrmaliger Beobachtung kein von dem der Kontrolltiere abweichendes Verhalten. Insbesondere traten die bei der Darreichung von einmaligen toxischen Gaben beschriebenen Vergiftungserscheinungen — Spasmen und Schwäche der Muskulatur, Durchfälle, Lungenödem (SAB-

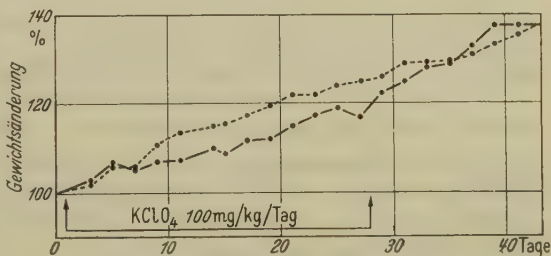


Abb. 1. Das Verhalten des Körpergewichts bei unbehandelten Normaltieren (—) und bei Ratten, die KClO₄ erhielten (---). Abszisse: Zeit in Tagen, Ordinate: Gewichtsänderung gegenüber dem Ausgangswert.

BATANI, 1927; EICHLER, 1950) — nicht auf. Die Sterblichkeit war bei Versuchs- und Kontrolltieren von gleichem Ausmaß. Das Körpergewicht stieg unabhängig von Dosis (100 oder 250 mg/kg täglich) und Dauer der Verabfolgung bei Versuchstieren und unbehandelten Kontrollen in gleicher Weise an (Abb. 1). Anzeichen für einen schädigenden Einfluß des KClO₄ auf die blutbildenden Gewebe waren nicht vorhanden. Nach 28tägiger Zufuhr von täglich 100 mg/kg wurden weder eine Anämie noch eine Leukopenie noch ein Absinken der Zahl der myeloischen Zellen im peripheren Blut beobachtet (Tab. 1).

2. *Veränderungen von Schilddrüsengewicht und -histologie.* Unsere Ergebnisse hinsichtlich des Schilddrüsengewichts unter den verschiedenen Versuchsbedingungen sind in Tab. 2 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Applikation von Kaliumperchlorat (100 mg/kg/Tag)

zu einer Zunahme des Schilddrüsengewichts führte, die im Mittel nach 7 Tagen etwa 11,7%, nach 14 Tagen etwa 82% und nach 28 Tagen etwa 116% betrug. Dieser Effekt war spontan reversibel, insofern als das Schilddrüsengewicht 14 Tage nach Abschluß einer 28tägigen Behandlung mit der oben angegebenen Dosis nur noch etwa 8,7% über dem Ausgangswert lag. Ähnlich, jedoch anfänglich stärker ausgeprägt, waren die

Tabelle 1. Vergleich der Erythrocyten- und Leukocytenzahlen und des prozentualen Anteils der myeloischen Zellen im Differential-Blutbild bei Kontrolltieren und nach 28 tägiger Verabfolgung von Kaliumperchlorat (100 mg/kg/Tag).

	Erythrocyten (10 ⁶ /mm ³)	Leukocyten (10 ³ /mm ³)	Myeloische Zellen %
Kontrollen (K)	7,14 ± 0,227 n = 7	18,70 ± 2,920 n = 5	21,2 ± 2,24 n = 5
KClO ₄ (A ₄)	7,52 ± 0,147 n = 5	16,51 ± 1,73 n = 5	20,8 ± 1,60 n = 5
p: K / A ₄	> 0,1	> 0,1	> 0,1

Tabelle 2. Verhalten des Schilddrüsengewichts (mg/100 g Körpergewicht) bei Zufuhr von Kaliumperchlorat, Methylthiouracil, Thyroxin, Thyroxin und KClO₄ (Normaltiere), von KClO₄, TSH, KClO₄ und TSH (hypophysectomierte Tiere). Aufschlüsselung der Gruppenbezeichnungen siehe Methodik.

Gruppe:	K	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇
Schilddr. Gew. (M)	8,51	9,49	15,52	19,10	18,34	9,25	14,20	18,10
σ_M	± 1,35	± 0,31	± 1,83	± 1,71	± 1,50	± 0,30	± 0,59	± 0,61
Zahl der Tiere (n)	10	5	5	4	4	4	5	3
Gruppe:	B	C ₁	C ₂	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	
Schilddr. Gew. (M)	19,00	6,60	6,94	5,36	9,82	9,81	5,58	
σ_M	± 1,24	± 0,36	± 0,54	± 0,21	± 0,65	± 0,48	± 0,25	
Zahl der Tiere (n)	4	4	4	7	8	8	7	

Gewichtsveränderungen nach 250 mg/kg/Tag: Gewichtszuwachs nach 7 Tagen etwa 67%, nach 14 Tagen etwa 113%. Die Differenz der beiden angegebenen 14-Tageswerte ist statistisch nicht gesichert ($p > 0,1$; vgl. Tab. 4, in der die statistischen Auswertungen zusammengefaßt sind). Zum Vergleich sei erwähnt, daß MTU (100 mg/kg/Tag) nach 14 Tagen zu einer Gewichtssteigerung von 124% geführt hat.

Dagegen trat eine Vergrößerung der Schilddrüse nicht ein, wenn gleichzeitig mit Kaliumperchlorat Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag, s. c.) gegeben wurde. Sowohl bei der alleinigen als auch nach der mit KClO₄ kombinierten Thyroxinverabfolgung kam es zu einer Abnahme des Schilddrüsengewichts gegenüber der Norm, und zwar bei Thyroxin um etwa 22%, bei der anderen Gruppe um etwa 18,5%. Den Veränderungen

des Gewichts entsprach der histologische Befund: KClO_4 führte zu einem einer Schilddrüsenaktivierung entsprechenden Bild, während nach gleichzeitiger Gabe von Thyroxin diese Wirkung vermißt wurde.

An hypophysektomierten Tieren rief Kaliumperchlorat keine Hyperplasie der Schilddrüse hervor. Die bei hypophysenlosen Ratten durch thyreotropes Hormon (TSH) bewirkte Schilddrüsenvergrößerung wurde durch KClO_4 weder verstärkt noch vermindert. Im einzelnen nahm das Schilddrüsengewicht gegenüber den unbehandelten hypophysenlosen Tieren nach KClO_4 um etwa 4% ($p = > 0,1$), nach TSH sowie nach TSH und KClO_4 um jeweils 85% zu.

Die in allen Gruppen der Normaltiere gemessenen Nebennierengewichte wichen nur in den beiden mit Thyroxin behandelten Gruppen signifikant von dem Mittelwert der unbehandelten Kontrollen ab (Tab. 3).

Tabelle 3. Verhalten des Nebennierengewichts (mg/100 g Körpergewicht) bei Zufuhr von Kaliumperchlorat, Thyroxin, Thyroxin und KClO_4 (Normaltiere), von KClO_4 , TSH, KClO_4 und TSH (hypophysektomierte Tiere). Aufschlüsselung der Gruppenbezeichnungen siehe Methodik.

Gruppe:	K	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Nebenn. Gew. (M)	19,05	8,00	10,94	10,50	8,45
σ_M	$\pm 0,92$	$\pm 0,37$	$\pm 0,42$	$\pm 0,51$	$\pm 0,38$
Zahl der Tiere (n)	10	7	7	8	7
Gruppe:	A ₄	A ₅	A ₇	C ₁	C ₂
Nebenn. Gew. (M)	21,95	16,90	21,00	34,60	36,80
σ_M	$\pm 1,95$	$\pm 0,95$	$\pm 1,88$	$\pm 2,44$	$\pm 3,88$
Zahl der Tiere (n)	5	4	3	4	4

Hier betrug der Gewichtsanstieg 82% (Thyroxin) bzw. 93% (Thyroxin und KClO_4). Diese Differenz von 11% ist statistisch nicht gesichert. Bei Ratten, denen die Hypophyse operativ entfernt worden war, kam es unter TSH und bei kombinierter Applikation von TSH und KClO_4 zu einer deutlichen Gewichtszunahme der an und für sich atrophischen Nebennieren. Wie bei den Normaltieren blieb KClO_4 auch hier ohne Einfluß auf das Gewicht der Nebennieren.

3. *Gewebsatmung.* Bei länger dauernder Zufuhr von Kaliumperchlorat wurde die Gewebsatmung der Leber eindeutig gesenkt (Abb. 2; Statistik siehe Tab. 4). Während nach 7 Tagen unter 100 mg/kg/Tag KClO_4 der QO_2 der Leber um etwa 10% über der Norm lag, hatte in diesem Zeitpunkt die höhere Dosis (250 mg/kg/Tag) bereits zu einer Senkung der Gewebsatmung um etwa 29% geführt. Nach 14tägiger Fütterung der letzten Dosis kam es nicht zu einem weiteren Abfall der Atmungsgröße; dagegen war jetzt der Sauerstoffverbrauch des Gewebes nach Gabe der kleineren Dosis auf unter der Norm liegende Werte gefallen, und zwar erst

um etwa 11%. Nach weiteren 14 Tagen ergab sich am Ende der vierten Woche eine Herabsetzung der Atmung um etwa 19,5%. Ebenso wie die Wirkung auf das Schilddrüsengewicht verschwand auch der stoffwechsel-

senkende Effekt des KClO_4 nach Absetzen der Medikation. Das Ausmaß der Stoffwechselsenkung der größeren Dosis KClO_4 entsprach nach 14 Tagen etwa dem nach einer gleichlangen Fütterung mit MTU (100 mg/kg/Tag).

Orientierende Versuche ergaben weiterhin, daß am isolierten Gewebe in vitro zugesetztes KClO_4 in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ — $5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ keine Beeinflussung der Atmung zeigte.

Parenteral in hoher Dosierung zugeführtes Thyroxin wurde in seiner die Gewebsatmung steigernden Wirkung durch KClO_4 nicht gehemmt, der QO_2 betrug nach Thyroxin (11 Tage) $10,67 \pm 0,438$ bzw. nach Thyroxin in Kombination mit KClO_4 $11,65 \pm 0,286$ gegenüber einem Wert von $6,99 \pm 0,172$ der unbehandelten Kontrollen. Diesem Befund entsprach das Verhalten des Körpergewichts. Der durch Thyroxin hervorgerufene Gewichtssturz wurde durch gleichzeitige KClO_4 -Gaben nicht beeinflusst (Abb. 3).

An hypophysenlosen Tieren wurde durch KClO_4 (250 mg/kg, 10 Tage) der Sauerstoffverbrauch der Leber gegenüber unbehandelten hypophysenlosen Tieren nicht mehr wesentlich gesenkt (Abb. 4). Wurde hypophysectomierten Ratten TSH gegeben, so resultierte die bekannte Steigerung des Stoffwechsels (in unserer Versuchsanordnung um etwa 37,5%). Dieser Effekt blieb dagegen aus, wenn mit dem TSH gleichzeitig Kaliumperchlorat verabreicht wurde.

4. *Leberfermente.* Die Untersuchung der *alkalischen Phosphatase* der Leber (Abb. 5) ergab einen von der Dauer der Kaliumperchloratapplikation abhängigen Anstieg der Fermentaktivität, der nach 14 Tagen etwa 48% und nach 28 Tagen etwa 93% gegenüber dem

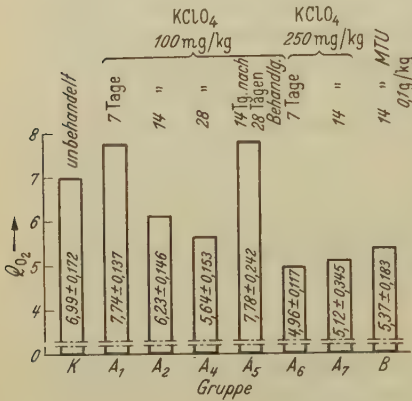


Abb. 2. Übersicht über das Verhalten des Gewebstoffwechsels (Leber) unter Behandlung mit KClO_4 und MTU im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Abszisse: einzelne Gruppen; Ordinate: Sauerstoffverbrauch (QO_2). Statistische Auswertung vgl. Tab. 4.

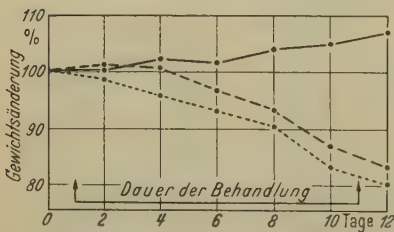


Abb. 3. Das Verhalten des Körpergewichts bei unbehandelten Normaltieren (—), unter Behandlung mit Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag) (— · — · —) und unter Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag) + KClO_4 (100 mg/kg/Tag) (- - - -). Abszisse: Zeit in Tagen; Ordinate: Änderungen des Gewichts gegenüber dem Ausgangswert.

Ausgangswert ausmachte. 14 Tage nach Abschluß einer 4wöchigen Behandlung (100 mg/kg/Tag) war die Aktivität wieder auf normale Werte abgesunken. Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag) bewirkte nach 11 Tagen eine

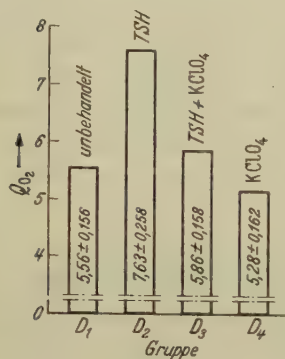


Abb. 4.

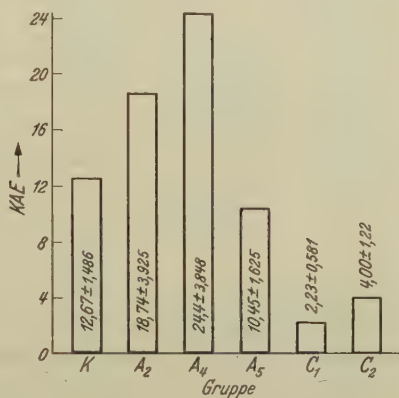


Abb. 5.

Abb. 4. Übersicht über das Verhalten des Gewebstoffwechsels (Leber) von hypophysectomierten Ratten unter Behandlung mit TSH, mit TSH + KClO₄ bzw. mit KClO₄ im Vergleich zu unbehandelten hypophysectomierten Tieren. Dosierung: TSH 7 Tage 15 MSE, dann 3 Tage 30 MSE; KClO₄ 250 mg/kg/Tag; 10 Tage. Abszisse: einzelne Gruppen; Ordinate: Sauerstoffverbrauch (QO₂). Statistische Auswertung vgl. Tab. 4.

Abb. 5. Das Verhalten der Aktivität der alkalischen Leberphosphatase während und nach einer Behandlung mit KClO₄ (100 mg/kg/Tag) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (K). Dauer der Behandlung: A₂: 14 Tage; A₄: 28 Tage; A₅: 28 Tage, dann 14 Tage unbehandelt. C₁: Ratten, die Thyroxin (100 mg/kg/Tag), 11 Tage, C₂: Ratten, die 0,3 mg/100 g/Tag Thyroxin + KClO₄ (100 mg/kg/Tag) erhielten (11 Tage). Abszisse: einzelne Gruppen; Ordinate: Aktivität der alkalischen Phosphatase in KING-ARMSTRONG-Einheiten. Statistische Auswertung vgl. Tab. 4.

erhebliche Abnahme der Fermentaktivität, die auch bei kombinierter Anwendung von Thyroxin und KClO₄ deutlich nachweisbar war, ohne daß die Differenz der beiden Werte (C₁, C₂; vgl. Tab. 4) statistisch zu sichern gewesen wäre.

Die Aktivität der Cholin oxydase wurde durch Kaliumperchlorat im Verlaufe einer 4wöchigen Fütterung nicht verändert. Dagegen kam es bei Thyroxinzufuhr und bei kombinierter Verabfolgung von Thyroxin und Kaliumperchlorat zu einer Abnahme der Fermentaktivität um 30,5% bzw. 36,0% (Abb. 6).

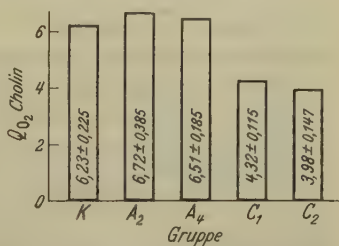


Abb. 6. Aktivität der Cholin oxydase der Leber bei unbehandelten Kontrollen, bei Ratten, denen KClO₄ (100 mg/kg/Tag) zugeführt wurde (A₂: 14 Tage, A₄: 28 Tage), bei Ratten, denen Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag; C₁) appliziert wurde und bei Ratten, denen Thyroxin (0,3 mg/100 g/Tag) kombiniert mit KClO₄ (100 mg/kg/Tag) verabfolgt wurde (C₂). Abszisse: einzelne Gruppen; Ordinate: Aktivität der Cholin oxydase, angegeben als QO₂ Cholin. Statistische Auswertung vgl. Tab. 4.

Tabelle 4. *Statistische Auswertung der in Text, Tabellen und Abbildungen zitierten Mittelwerte der einzelnen Gruppen. Aufschlüsselung siehe Methodik.*

a) Schilddrüsengewicht.

Verglichene Gruppen	p	Verglichene Gruppen	p	Verglichene Gruppen	p
K/A ₁	> 0,1	A ₁ /A ₂	0,005**	D ₁ /D ₂	< 0,001***
K/A ₂	0,01*	A ₂ /A ₄	> 0,1	D ₁ /D ₃	< 0,001***
K/A ₃	< 0,001***	A ₄ /A ₅	< 0,001***	D ₁ /D ₄	> 0,1
K/A ₄	< 0,001***	A ₁ /A ₆	< 0,001***	D ₂ /D ₃	> 0,1
K/A ₅	> 0,1	A ₂ /A ₇	> 0,1	D ₂ /D ₄	< 0,001***
K/A ₆	0,0025**	A ₆ /A ₇	0,005**	D ₃ /D ₄	< 0,001***
K/A ₇	< 0,001***	A ₂ /B	> 0,1	C ₁ /C ₂	> 0,1
K/B	< 0,001***	A ₇ /B	> 0,1		
K/C ₁	> 0,1	A ₁ /C ₂	0,004**		
K/C ₂	> 0,1	A ₂ /C ₂	0,007**		

b) Nebennierengewicht.

K/A ₄	> 0,1	K/C ₁	< 0,001***	D ₁ /D ₂	< 0,001***
K/A ₅	> 0,1	K/C ₂	< 0,001***	D ₁ /D ₃	0,002**
K/A ₇	> 0,1	C ₁ /C ₂	> 0,1	D ₂ /D ₃	> 0,1
A ₄ /A ₅	> 0,1	D ₁ /D ₄	> 0,1	D ₃ /D ₄	0,009**

c) Gewebsatmung.

K/A ₁	0,004**	A ₁ /A ₂	< 0,001***	D ₁ /D ₂	< 0,001***
K/A ₂	0,003**	A ₂ /A ₄	0,012*	D ₁ /D ₃	> 0,1
K/A ₄	0,001**	A ₄ /A ₅	< 0,001***	D ₁ /D ₄	> 0,1
K/A ₅	0,02*	A ₁ /A ₆	< 0,001***	D ₂ /D ₃	< 0,001***
K/A ₆	< 0,001***	A ₂ /A ₇	0,008**	D ₂ /D ₄	< 0,001***
K/A ₇	< 0,001***	A ₆ /A ₇	> 0,1	D ₃ /D ₄	0,02*
K/B	< 0,001***	A ₂ /B	0,002**	A ₇ /B	> 0,1

d) alkalische Phosphatase.

K/A ₂	> 0,1	A ₂ /A ₄	> 0,1	K/C ₁	< 0,001***
K/A ₄	0,02*	A ₄ /A ₅	0,014*	K/C ₂	< 0,001***
K/A ₅	> 0,1			C ₁ /C ₂	> 0,1

e) Cholin oxydase.

K/A ₂	> 0,1	A ₂ /A ₄	> 0,1	K/C ₂	< 0,001***
K/A ₄	> 0,1	C ₁ /C ₂	> 0,1	K/C ₁	< 0,001***

Besprechung der Ergebnisse.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, verursachte Kaliumperchlorat eine Herabsetzung der Gewebsatmung der Leber. In Untersuchungen, die unternommen wurden, um diesen stoffwechselenkenden Effekt des Kaliumperchlorats in seinem Mechanismus aufzuklären, wurde gefunden, daß dem Kaliumperchlorat in vitro keine direkte Wirkung auf die Gewebsatmung zukommt, auch nicht in Konzentrationen, welche die in vivo bei

täglichen Gaben von 100 bzw. 250 mg/kg zu erwartenden Konzentrationen weit überstiegen. Gegen die Möglichkeit eines peripheren Antagonismus zwischen Thyroxin und Kaliumperchlorat spricht eine Reihe von Befunden. Die gleichzeitige Verabfolgung von Kaliumperchlorat vermag die stoffwechselsteigernde Wirkung hoher Thyroxingaben nicht zu hemmen. Dem entspricht das Verhalten des Körpergewichts, das unter kombinierter Applikation von Kaliumperchlorat und Thyroxin in gleicher Weise absank wie bei alleiniger Thyroxinzufuhr. Und schließlich erscheint ein peripherer Antagonismus unwahrscheinlich, da die durch Thyroxin hervorgerufene Abnahme sowohl der Aktivität der alkalischen Phosphatase (vgl. KOCHAKIAN u. BARTLETT, 1948) als auch der Cholinoydase der Leber durch Kaliumperchlorat nicht verhindert wurde.

Bei hypophysektomierten Tieren ließ die Zufuhr von Kaliumperchlorat keine Stoffwechselsenkung mehr erkennen. Dagegen wurde der durch TSH beim hypophysenlosen Tier bewirkte Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Leber durch Kaliumperchlorat unterbunden. Überblickt man die soeben besprochenen Ergebnisse unter Berücksichtigung der von WYNGAARDEN u. Mitarb. (1952, 1953) erhobenen Befunde, so lassen diese den Schluß zu, daß die Stoffwechselwirkung des Kaliumperchlorats wahrscheinlich über eine direkte Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion zustande kommt, und zwar am ehesten durch eine Hemmung der Thyroxinsynthese. Welche der bei der physiologischen Thyroxinbildung wichtigen Stufen — z. B. Iodinase- oder Peroxydasewirkung (vgl. SALTER, 1950) — betroffen wird, läßt sich auf Grund unserer bisherigen Untersuchungen nicht entscheiden, ist jedoch Gegenstand weiterer Experimente.

Im einzelnen sei noch erwähnt, daß die anfänglich nach Anwendung der kleineren Dosis Kaliumperchlorat vorhandene geringe Stoffwechselsteigerung auch nach anderen antithyreoidalen Mitteln beobachtet wurde (KOPFU. Mitarb., 1949). Sie wird auf eine Ausschüttung von präformiertem Thyroxin durch die einsetzende Gegenregulation von seiten der Hypophyse bezogen. In ihrer Stoffwechselwirkung entspricht bei 14tägiger Verabfolgung eine Dosis von 250 mg/kg/Tag KClO_4 dem Effekt einer gleichlangen Fütterung von 100 mg/kg/Tag MTU. Wie bei anderen antithyreoidalen Stoffen ist auch beim Kaliumperchlorat die Wirkung auf die Gewebsatmung nach Absetzen des Mittels voll reversibel.

Diese Ergebnisse hinsichtlich des Wirkungsmechanismus des Kaliumperchlorats finden ihre Bestätigung bei Auswertung der Veränderungen der Schilddrüsen Gewichte. Kaliumperchlorat führt zu einer Vergrößerung der Schilddrüse, die von Dosis und Dauer der Behandlung abhängig ist. Auch die Veränderungen des Schilddrüsen Gewichts gehen wie die des Gewebsstoffwechsels nach Abschluß der Medikation zurück. Signifikante

Unterschiede zwischen den Schilddrüsengewichten nach 14tägiger Verabfolgung von 100 mg bzw. 250 mg/kg/Tag KClO_4 und 100 mg/kg/Tag MTU bestehen nicht.

Die beschriebene Vergrößerung der Schilddrüse ist gebunden an das Vorhandensein der Hypophyse; bei hypophysektomierten Ratten ist die Zufuhr von Kaliumperchlorat nicht mehr von einer Gewichtszunahme der Schilddrüse gefolgt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in bezug auf die Wirkung des TSH bzw. des TSH in Kombination mit Kaliumperchlorat auf die Gewebsatmung hypophysenloser Ratten ist der Einfluß des TSH auf die Größe der Schilddrüse bei gleicher Anordnung voll erhalten. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, daß der anti-thyreoidale Effekt des Kaliumperchlorats nicht auf einen Angriff an der Hypophyse bzw. am TSH selbst zurückgeführt werden kann, sondern die Bildung von Thyroxin durch Kaliumperchlorat vermindert wird. Diese Ansicht erhält ferner eine Stütze in den Ergebnissen einer Versuchsreihe, in der Kaliumperchlorat gleichzeitig mit Thyroxin gegeben wurde: gleichgültig ob diese Kombination oder nur Thyroxin appliziert wurde, kam es in jedem Fall zu der bekannten Involution der Schilddrüse. Es bleibt offen, ob dieser Thyroxineffekt der Verhinderung einer Schilddrüsenhyperplasie auch durch anorganisches Jod oder Dijodtyrosin zu erzielen ist, womit bekanntlich die durch Methylthiouracil verursachte Hyperplasie der Schilddrüse aufgehoben werden kann, ohne die Stoffwechselsenkung zu vermindern (RAWSON u. Mitarb., 1945; KLEINSORG u. Mitarb., 1949).

Während es unter Behandlung mit Methylthiouracil zu einer Nebennierenatrophie kommen kann (FREEDMAN u. GORDON, 1950; ZARROW u. ZARROW, 1951), konnten wir für das Kaliumperchlorat keinen solchen Befund erheben. Der von mehreren Autoren (KADEN u. Mitarb., 1937; MILLER u. RIDDLE, 1939) beschriebene Gewichtsanstieg der Nebennieren nach Zufuhr von Thyroxin war auch bei unseren Versuchen ausgeprägt vorhanden und wurde durch Kaliumperchlorat nicht verhindert, ein weiteres Anzeichen dafür, daß ein peripherer Antagonismus dieser beiden Substanzen nicht anzunehmen ist.

Obwohl im Laufe der Versuchszeit ein Teil der Tiere bis zu 3,5 g/kg KClO_4 erhielt, waren toxische Nebenerscheinungen nicht nachweisbar. Dies kann zum Teil auf die außerordentlich rasche Ausscheidung dieser Substanz zurückgeführt werden, die nach EICHLER (1930) und DURAND (1938) in den ersten 24 Std 90% bzw. 85% einer einmaligen Gabe beträgt. Auch eine Schädigung der Leber durch Kaliumperchlorat ist unwahrscheinlich, da einmal das histologische Bild keine pathologischen Veränderungen zeigt und zum anderen die beiden untersuchten Leberenzyme (Cholin oxydase und alkalische Phosphatase) in ihrer

Aktivität nicht vermindert werden. Die alkalische Phosphatase wies sogar entsprechend histologischen Beobachtungen nach Methylthiouracil (KROON, 1949) unter Kaliumperchlorat einen Anstieg ihrer Aktivität auf.

Ebenso waren pathologische Abweichungen im Blutbild nach längerer Zufuhr von Kaliumperchlorat nicht festzustellen. Dieser Befund erscheint insofern bemerkenswert, als dem Methylthiouracil nicht nur beim Menschen, sondern auch im Tierversuch an der Ratte eine Einwirkung auf das weiße Blutbild zukommt (FISCHER u. Mitarb., 1948).

Zusammenfassung.

1. Untersuchungen an Ratten ergaben, daß das Kaliumperchlorat eine antithyreoidale Wirkung besitzt. Diese kommt wahrscheinlich über eine Hemmung der Thyroxinsynthese zustande. Denn durch Kaliumperchlorat wird am Normaltier die Gewebsatmung der Leber vermindert und am hypophysenlosen Tier der stoffwechselsteigernde Effekt des thyreotropen Hormons unterdrückt, während es in vitro keinen Einfluß auf die Gewebsatmung hat und auch ein peripherer Antagonismus zwischen ihm und Thyroxin nicht nachweisbar ist.

2. Die nach Kaliumperchloratzufuhr beobachtete Vergrößerung der Schilddrüse ist hypophysär bedingt; sie bleibt am hypophysenlosen Tier aus und ist zudem durch Thyroxin unterdrückbar.

3. Der Effekt einer 14tägigen Applikation von 250 mg/kg/Tag Kaliumperchlorat entspricht in bezug auf Stoffwechsel und Schilddrüsengewicht dem einer gleichlangen Zufuhr von 100 mg/kg/Tag Methylthiouracil.

4. Toxische Nebenwirkungen wurden bei den angewendeten Dosen Kaliumperchlorat nicht beobachtet. Sie wurden geprüft an Allgemeinverhalten, Sterblichkeit, Körpergewicht, Blutbild sowie am histologischen und fermentchemischen Verhalten der Leber.

Literatur.

- ABELIN, I.: Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 187 (1947). — ANDIK, I., L. BALOGH u. S. DONHOFFER: Experientia (Basel) **5**, 249 (1949). — DURAND, J.: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **20**, 423 (1938). — EICHLER, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **144**, 251 (1930). — Hdbch. d. exper. Pharmacol. Erg. Werk. Bd. 10. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — FISCHER, L., R. KOPF u. A. LOESER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **205**, 730 (1948). — FREEDMAN, H. H. and A. S. GORDON: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 229 (1950). — KADEN, E., C. OEHME u. K. WEBER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **184**, 573 (1937). — KIRBERGER, E., u. G. MARTIN: Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 268 (1950). — KLEINSORG, H., R. KOPF u. A. LOESER: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 1525. — KOCHAKIAN, C. D. and M. N. BARTLETT: J. of Biol. Chem. **176**, 243 (1948). — KOPF, R., A.

LOESER, G. MEYER u. H.-J. BIELIG: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **207**, 256 (1949). — KROON, D. B.: Acta endocrin. **2**, 227 (1949). — KRÜSKEMPER, H.-L., u. W. DIRSCHERL: Biochem. Z. **323**, 512 (1953). — MILLER, R. A. and O. RIDDLE: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **41**, 518 (1939). — PÄTAU, K.: Z. Biol. **63**, 152 (1943). — POTTER, R. V., and C. H. ELVEHJEM: J. of Biol. Chem. **114**, 495 (1936). — RAWSON, R. W., F. D. MOORE, W. PEACOCK, J. H. MEANS, O. COPE and C. R. RIDDLE: J. Clin. Invest. **24**, 869 (1945). — SABBATANI, L.: Arch. per le Sci. med. **51**, 301 (1927). — SALTER, W. T.: in The Hormones, II, 301ff. New York: Acad. Press 1950. — WYNGAARDEN, J. B., B. M. WRIGHT and P. WAYS: Endocrinology **50**, 537 (1952). — WYNGAARDEN, J. B., J. B. STANBURY and B. RAPP: Endocrinology **52**, 568 (1953). — ZARROW, M. X. and I. G. ZARROW: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 620 (1951).

Dr. HANS-LUDWIG KRÜSKEMPER, Dr. HANS KLEINSORG,
Medizin. Univ. Klinik Göttingen, Kirchweg 1.

Aus dem Physiologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena
(Direktor: Prof. Dr. FRIEDRICH SCHWARZ).

Das Elektretinogramm bei normalen und mit γ -Hexachlorcyclohexan vergifteten Fröschen.

Von

ERNST VOLKMER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. Juli 1954.)

In den Arbeiten von SCHWARZ (1950, 1952, 1953) und von VOLKMER und WINTZER (1954) wird über die Wirkung des γ -Hexachlorcyclohexans (γ -HCC) auf das Zentralnervensystem einiger Kaltblüter berichtet. Aus den Versuchen geht hervor, daß die Tiere auf Lichtreize mit Zuckungen und Krämpfen reagieren. Dabei erhob sich die Frage, ob nicht die Aussicht besteht, durch die Untersuchung des Elektretinogramms (ERG) etwas über den Angriffsort des γ -HCC zu erfahren. In der vorliegenden Arbeit wird über den Vergleich der Elektretinogramme von normalen und von mit γ -HCC vergifteten Fröschen berichtet.

Methodik.

Die Versuche wurden von Januar bis Mai 1954 durchgeführt. Als Versuchstiere dienten Frösche (*Rana temporaria* und *esculenta*), deren Gewicht zwischen 20 und 40 g lag. Über die Technik und Dosierung der γ -HCC-Applikation wurde in der Arbeit von SCHWARZ (1952) berichtet. Die Versuchstiere wurden nach der Injektion von 3 oder 4 mg γ -HCC 24—50 Std im Dunkeln gehalten. Die Pupillen wurden durch Atropin erweitert. Ein Teil der Tiere wurde mit 0,2—0,5 cm³ einer 0,1%igen Curarelösung gelähmt. Nach Behandlung mit Novocain wurden ein Teil der Kopfhaut und die Nickhaut entfernt. Die anderen Versuchstiere wurden vor der Präparation dekapitiert. Danach wurden die Versuchstiere in einen lichtdichten Metallkasten (zur elektrischen Abschirmung) gesetzt, und 3 min darauf wurde das erste ERG abgeleitet. Zur Ableitung wurden RINGER-Agar-Elektroden nach MÜLLER-LIMMROTH (1953) mit 4 k Ω Widerstand verwendet.

Zur Verstärkung der Aktionspotentiale diente ein Gleichstromgegentakt-Verstärker nach einer Schaltung von AUTRUM (1950) mit einer maximalen Verstärkung von 5 mal 10⁵. Die Heizung erfolgte aus Batterien. Die Anodenspannungen wurden einer in unserem Institut entwickelten Netzanode entnommen, bei welcher Änderungen der Netzspannungen bis zu $\pm 20\%$ ohne Einfluß auf den Verstärker blieben.

Mit Hilfe eines Kathodenstrahloszillographen wurde auf Agfa-Oszillographenpapier registriert. Die Registriergeschwindigkeit betrug 64 mm/s und wurde nötigenfalls bis auf 23 mm/s herabgesetzt.

Zur Belichtung diente eine Mattglasscheibe von 18 mm Durchmesser und einer Leuchtdichte von 450 asb. Ein Relais betätigte den Verschuß, um Geräusche möglichst zu vermeiden. Die Reizmarkierung erfolgte durch eine Glimmlampe,

welche von einer Photozelle gesteuert wurde. Zur Zeitmarkierung wurde eine Glimmlampe mit 50 Lichtblitzen pro Sekunde verwendet. Die Glimmlampe wurde mit der Netzwechselfspannung von 50 Hz nach Einweggleichrichtung betrieben.

Versuche und Ergebnisse.

In den Abb. 1 und 2 werden die Elektretinogramme von unvergifteten und mit γ -HCC vergifteten Fröschen miteinander verglichen. In Abb. 1 sind 2 Oszillogramme wiedergegeben worden. Abb. 1a zeigt

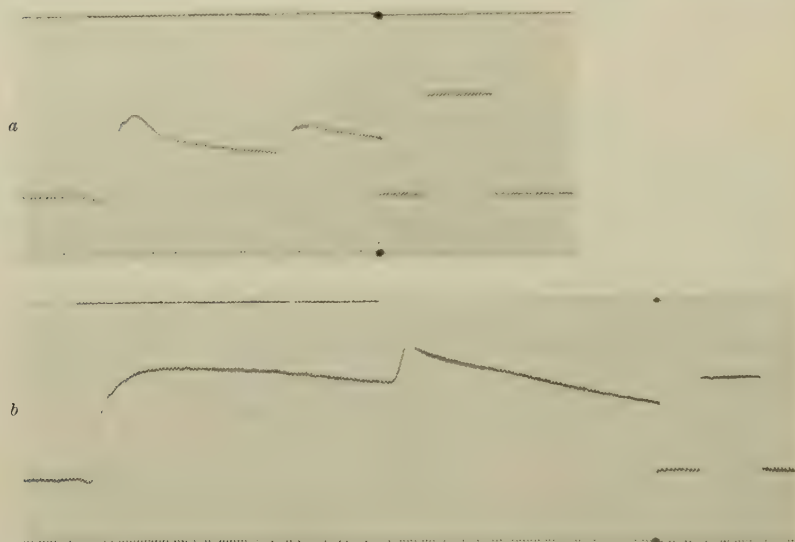


Abb. 1. Die γ -HCC-Einwirkung auf das ERG des Frosches. *a* normales ERG; Reizdauer: 1 sec (obere Kurve, dicker Strich). ERG: mittlere Kurve; dahinter Eichzacke: $400 \mu\text{V} = 33 \text{ mm}$. Untere Kurve („Perlschnur“); Zeitschreibung 50 Lichtblitze/sec. *b* ERG 24 Std nach der Injektion von 3 mg γ -HCC; Reizdauer: 1,6 sec; Eichzacke: $400 \mu\text{V} = 31 \text{ mm}$; Registriergeschwindigkeit: 62 mm/sec.

das Retinogramm eines unvergifteten Frosches. Die *b*-Welle hat einen deutlichen Gipfel, fällt danach steil ab und nähert sich nach einem Bogen langsam dem Bestandpotential. Das ERG in Abb. 1 *b* wurde 25 Std nach der Injektion von 3 mg γ -HCC von einem 30 g schweren Frosch in situ abgeleitet. Die *b*-Welle hat keinen ausgeprägten Gipfel und der Bogen in Richtung auf das Bestandpotential fehlt vollkommen.

Der höchste Gipfel der *b*-Welle von unvergifteten Fröschen hatte eine Amplitude von $600 \mu\text{V}$. Bei den Retinogrammen nach der γ -HCC-Einwirkung waren die Amplituden der *b*-Wellenerhebungen bei 5 Fröschen größer als $700 \mu\text{V}$ und erreichten Höhen bis $1200 \mu\text{V}$.

In Abb. 2 werden die gemittelten Kurven der Retinogramme von 20 normalen und 20 mit γ -HCC vergifteten Fröschen miteinander verglichen.

Für die Abb. 2a wurden die Retinogramme von 20 normalen Fröschen übereinander gezeichnet und es wurde versucht, eine Mittelwertskurve daraus zu erhalten. Da die Gipfel der *a*-, *b*- und *d*-Wellen nicht bei allen Retinogrammen zur gleichen Zeit auftraten, wurden die mittleren Zeiten ihres Auftretens gemessen und bei diesen Zeiten die Gipfelpunkte der Wellen aufgetragen. Es wurden ferner die Amplituden dieser Gipfelpunkte gemessen und dann die Mittelwerte berechnet. Für die Berechnung der mittleren Kurve in Abb. 2b wurden nur die *a*- und *d*-Wellen besonders berücksichtigt, da bei den *b*-Wellen keine Gipfelpunkte zu bestimmen waren.

Man kann aus der gemittelten Kurve in Abb. 2b erkennen, daß das Potential der *b*-Welle höher als normal ist und daß der Bogen nach dem

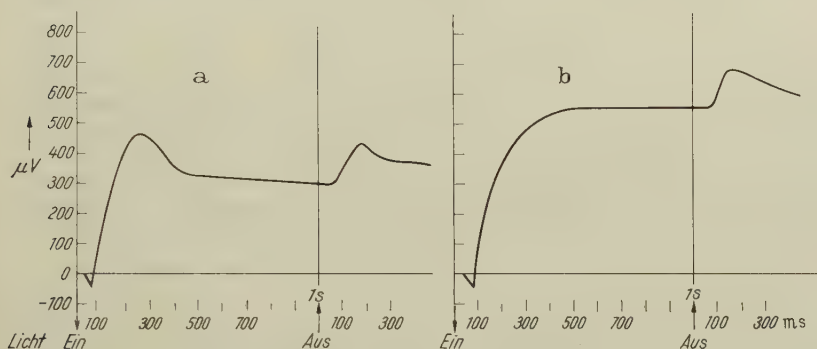


Abb. 2. Gemittelte Kurven der Retinogramme von je 20 Fröschen. a) unvergiftet. b) 24—50 Std nach der Injektion von 3 oder 4 mg γ -HCC.

Gipfel der *b*-Welle in Richtung auf das Bestandpotential fehlt. Da an der *a*-Welle und der *d*-Welle keine auffällige Änderung nachweisbar ist, kann über die Ursache der *b*-Wellenveränderung noch nichts bestimmtes ausgesagt werden. Eine sekundäre Erhebung, der *c*-Welle entsprechend, wurde nicht festgestellt, sie soll nach MÜLLER-LIMMROTH (1953) bei der Froschretina wahrscheinlich vollständig fehlen.

Oscillationen auf der *b*-Welle, wie sie von KOLDER (1953) beobachtet wurden, konnten gelegentlich festgestellt werden: an 4 normalen und 2 γ -HCC-Retinogrammen wurden Oscillationen mit Frequenzen um 25 Hz gefunden, die jedoch vielleicht auf die Lage der Elektroden zurückzuführen sind und Aktionsströme des Fasciculus opticus sein könnten.

Abb. 3 zeigt ein normales und ein γ -HCC-Retinogramm, die beide diese Oscillationen mit annähernd gleicher Amplitude auf der *b*-Welle haben.

Oscillationen im Verlauf der *b*-Welle wurden auch von BEST (1953) beschrieben. BEST hält es für wahrscheinlich, daß die Unregelmäßigkeiten der *b*-Welle auf „postsynaptische Potentiale“ zurückgeführt werden könnten.

Diskussion.

Der Charakter der b -Welle wird nach PIPER (1911) durch ein positives monphasisches Potential P_1 bestimmt, während der Beginn der a -Welle und der d -Welle durch das Absinken und wieder Ansteigen eines negativen monphasischen Potentials P_2 ausgelöst wird. Der Verlauf des ERG wird demnach durch Überlagerung der beiden Potentiale P_1 und P_2 bestimmt. Bei der Potentialdifferenzierung von MÜLLER-LIMMROTH (1953) wurde gleichfalls für beide Potentiale ein monphasischer Verlauf angenommen.

Die negative a -Welle des Retinogramms zeigt einen flachen Abfall und nach dem Gipfel einen steilen Anstieg; daraus ließe sich schließen, daß das Potential P_2 langsamer abfällt und das Potential P_1 schneller ansteigt. Der abwärts gerichtete Bogen nach dem Gipfel der b -Welle wird nach PIPER dadurch hervorgerufen, daß

das Potential P_2 sein Maximum erst erreicht, wenn das Potential P_1 sein Maximum schon erreicht hat. Wenn die beiden Maxima zur gleichen Zeit erreicht werden oder P_2 sein Maximum vor P_1 erreicht, würde der abwärts gerichtete Bogen der b -Welle fortfallen.

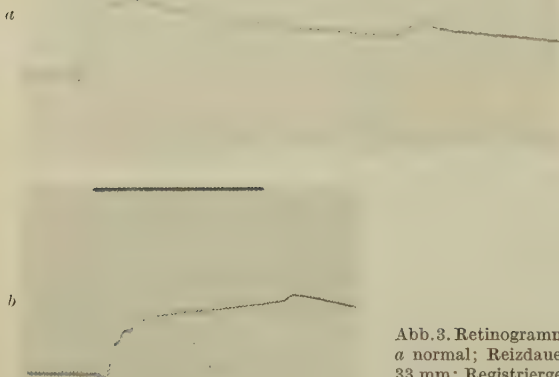


Abb. 3. Retinogramme mit Oscillationen auf der b -Welle. a normal; Reizdauer: 1,5 sec; Eichzacke: 400 μ V = 33 mm; Registriergeschwindigkeit: 64 mm/sec. b Nach γ -HCC-Einwirkung; Reizdauer: 1 sec; Eichzacke: 400 μ V = 31 mm; Registriergeschwindigkeit: 53 mm/sec. (Reizmarkierung und Zeitschreibung vgl. Abb. 1.)

Die Retinogramme haben nach der γ -HCC-Einwirkung eine höhere Amplitude der b -Welle als die normalen Retinogramme. Der Bogen nach dem Gipfel der b -Welle konnte in keinem der bisher durchgeführten Versuche festgestellt werden. Es besteht also die Möglichkeit, daß durch die γ -HCC-Einwirkung das Verhältnis der Amplituden der Potentiale P_1 und P_2 zugunsten von P_1 verändert wird.

In der Arbeit von VOLKMER und WINTZER (1954) wurden an Fröschen während Vergiftung mit γ -HCC die Reflexzeiten nach Belichtung gemessen. Nach dem Einschalten des Lichtes waren die Reflexzeiten um 30–40 ms länger als nach Wegnahme des Lichtes. Bei allen Retinogrammen nach γ -HCC-Einwirkung war die Latenzzeit der b -Welle länger als die der d -Welle. Die Differenz der Latenzzeiten der b - und d -Wellen betrug durchschnittlich 24 ms. Dieses Ergebnis spricht für die Vermutung, daß die Potentiale der Retina für die Unterschiede der Reflexzeiten mitbestimmend sein können.

Daß die von KOLDER (1953) beobachteten Oscillationen auf der *b*-Welle hier nur in einigen Fällen beobachtet wurden, kann auf die Methodik der Arbeit zurückzuführen sein. KOLDER arbeitete mit einer Leuchtdichte von 130000 asb und beobachtete diese Oscillationen, mit höheren Amplituden als normal, nur bis zu einer Leuchtdichte von 1300 asb herab. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Leuchtdichte von nur 450 asb gearbeitet. Daß KOLDER die hier angegebene Veränderung der *b*-Welle (Wegfall des Bogens nach dem Gipfel der *b*-Welle in Richtung auf das Bestandpotential) nicht feststellen konnte, ist vielleicht dadurch zu erklären, daß er mit einem R-C-Verstärker arbeitete, der die Eigenschaft hat, daß er das Potential nach einer Konstanten zu dem Bestandpotential zurückführt. KOLDER fand, daß die Gesamthöhe der *b*-Welle unter γ -HCC-Einwirkung nicht zugenommen hätte. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche haben aber alle eine größere Amplitude der *b*-Welle nach γ -HCC-Einwirkung gezeigt.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit werden die Elektretinogramme normaler und mit γ -HCC vergifteter Frösche miteinander verglichen. Es wird festgestellt, daß nach Vergiftung mit γ -HCC das *b*-Wellenpotential höher als normal ist und daß der charakteristische Abfall der *b*-Welle fehlt. An der *a*-Welle und der *d*-Welle konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Eine *c*-Welle ist bei normalen und γ -HCC-Retinogrammen nicht gefunden worden. Nach der Theorie von PIPER (1911) besteht die Möglichkeit, daß durch die γ -HCC-Einwirkung das Verhältnis der Amplitude der Potentiale P_1 und P_2 zugunsten von P_1 verändert wird. Bei den vergifteten Fröschen ist die Latenzzeit der *b*-Welle gegenüber der Latenzzeit der *d*-Welle um 24 ms länger, was vermuten läßt, daß die Potentiale der Retina für die Unterschiede der Reflexzeiten nach Belichtung mitbestimmend sein können.

Literatur.

- AUTRUM, H.: Belichtungspotentiale und das Sehen der Insekten. Z. vergl. Physiol. **32**, 176 (1950). — BEST, W.: Gleichzeitige Registrierung von Elektretinogramm und spikes (Spitzenentladungen) an der Netzhautoberfläche. Z. Biol. **106**, 171 (1953). — KOLDER, H.: Hexachlorcyclohexanwirkung auf das Elektretinogramm des Frosches. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 433 (1953). — MÜLLER-LIMMROTH, H. W.: Elektretinographische Untersuchungen zum BUNSEN-ROSCOESEN Gesetz. Pflügers Arch. **256**, 488 (1953). — Untersuchungen zur Differenzkonstruktion des Elektretinogramms des Froschauges. Z. Biol. **105**, 324 (1953). — PIPER, H.: Über die Netzhautströme. Rubners Arch. f. Physiol. **1911**, 85. — SCHWARZ, F.: Weitere Versuche über die Wirkung kontaktinsektizider Stoffe auf einige Kaltblüter. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 121 (1950). — Sinnesphysiologische Untersuchungen an Fröschen über die Wirkung des γ -Hexachlorcyclohexan. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 358 (1952). — Weitere Sinnesphysiologische Untersuchungen über die Wirkung des γ -Hexachlorcyclohexan. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 194 (1953). — VOLKMER, E., u. H. WINTZER: Über die optisch-motorische Reflexerregbarkeit des mit γ -Hexachlorcyclohexan vergifteten Frosches. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 441 (1954).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. G. SCHUBERT).

Explosive Überdruckdekompression.

Von

H. KOLDER.

(Eingegangen am 20. Juli 1954.)

Die explosive Dekompression hat mit dem Erreichen großer Flughöhen durch gekammerte Flugzeuge eine gewisse praktische Bedeutung erlangt. Bei der Untersuchung des Problems, ob sich die sogenannte explosive Dekompression (expl. Dkp.), das ist eine Dekompression von Normaldruck oder $\frac{1}{3}$ Atmosphäre auf Unterdruck, mit einer expl. Dkp. von erhöhtem Druck auf Normaldruck vergleichen läßt — wobei als Maßstab die relativen Gasvolumensänderungen angenommen sind (HORNBERGER und BENZINGER) —, ergaben sich Tatsachen, die einen wesentlichen Beitrag zur Erklärung der Todesursache bei der expl. Dkp. darstellen. Bisher findet sich in der Literatur (HITCHCOCK, COREY, GELFAN, COLE, EGGLETON und andere) keine exakte und allgemein anerkannte Definition des Begriffes „explosive Dekompression“. Es erscheint aber nach den Arbeiten von LATNER sowie STICKNEY und NORTHUP und den hier mitzuteilenden Ergebnissen notwendig, den Begriff der expl. Dkp. einzuengen, so zwar, daß expl. Dkp. ein Druckfall ist, bei dem Explosionsdruckwellen bzw. Explosionssaugwellen auftreten. Druckänderungen, bei denen es zu einer nicht tödlichen Druckwelle kommt, sondern die etwa durch Anoxie oder Gasentbindung schädigen und dadurch eventuell zum Tode führen, sollten nicht mit „explosiver Dekompression“ bezeichnet werden. Die Dauer bis zum Druckausgleich beträgt bei der expl. Dkp. — je nach der Größe der Druckkammer und der Druckausgleichsöffnung — wenige Millisekunden.

Die mitzuteilenden Versuche betreffen: Auswirkung einer expl. Dkp. von erhöhtem Druck auf Normaldruck bei der unnarkotisierten Ratte, wobei die Dekompressionszeit, der Dekompressionsdruck und die Dauer der Exposition auf erhöhten Druck variiert werden. Weiter wurden Temperaturmessungen im Bauchraum von explosiv Unterdruck-dekomprimierten neugeborenen Ratten durchgeführt und histologische Befunde an Ganglienzellen von Ratten nach Überdruckdekompression erhoben.

Methodik.

Die Versuche wurden mit männlichen Inzuchtratten des Institutsstammes (Gewicht zwischen 150,0 und 250,0 g) durchgeführt. Die Überdruckbombe bestand aus einem Stahlrohr (92 mm lichte Weite, 1,3 l Inhalt, 20,5 cm² Querschnitt der Öffnung), dessen eine Ende zugeschweißt war. Die Öffnung des Rohres wurde mit einem massiven Deckel und einer Gummidichtung abgeschlossen. Der Riegelverschluß des Deckels war durch einen Hebel leicht und rasch zu öffnen. Kleinere Öffnungen dienten der Zufuhr von Preßluft (aus einer Bombe), zur Druckregistrierung, Drucksturzregistrierung und dem Luftabstrom bei ständigem Luftwechsel. Der Druck wurde mit einem Hohlfederanometer gemessen, die Drucksturzregistrierung optisch mit einem Membranmanometer. Die Temperatur in der Überdruckbombe wurde mit einem Widerstandsthermometer gemessen und auf 22,5° C ($\pm 1^\circ$ C) gehalten. Die Temperaturmessung in der Bauchhöhle von neugeborenen Ratten (24–72 Std alt) erfolgte mit einem Kupfer-Konstanten-Thermoelement und schnellschwingendem Galvanometer (70 Hz, 10^{-7} A) bei Unterdruckdekompression von Normaldruck auf 50 mm Hg in 0,02 sec. Eine Temperaturmessung bei Überdruckdekompression scheint wegen der wesentlich höheren Gasabsorption im Gewebe wenig aufschlußreich. Die LD₅₀ wurde mit einer probit analysis berechnet. Als Kriterium für „tot“ wurde angenommen: Sistieren der Atmung sofort nach der Dekompression (Zeit für die Herausnahme des Tieres aus der Überdruckbombe 8 sec); bis maximal 60 sec nach der Dekompression vereinzelt auftretende Schnappatmungen wurden nicht gewertet. Alle Tiere wurden autoptisch untersucht und von wesentlichen Organen histologische Schnitte angefertigt. Die Schnitte vom ZNS wurden nach BODIAN gefärbt. Dekomprimiert wurde standardmäßig in 2 Zeiten: in 5 msec (vom Überdruck bis zum Erreichen des Normaldruckes) bzw. in 1,5 sec. Der Überdruck wurde einheitlich auf jeder der Druckstufen 3 und 7 Std gehalten. Bei den Versuchen mit sofortiger expl. Dkp. dauerte das „Auf-Druck-Bringen“ etwa 10 sec.

Ergebnisse.

Dekompression in 5 msec.

Expositionsdauer	Druck:		
	2 atü	3 atü	4 atü
Tiere, davon tot			
0 Stunden	(10) 5	(10) 8	(10) 10
3 Stunden	(10) 1	(10) 5	(10) 9
7 Stunden	(11) 4	(10) 5	(10) 10

Dekompression in 1,5 sec.

Expositionsdauer	Druck: 4 atü	
	Tiere, davon sofort tot	bzw. tot nach einiger Zeit (Caissonkrankheit)
0 Stunden	(10) 0	0
3 Stunden	(10) 0	2
7 Stunden	(10) 0	8

Nach der Auswertung mit der probit analysis (wobei der Abszissenmaßstab nicht in logarithmischen Einheiten angenommen wurde) ergeben

sich für die jeweilige Aufenthaltsdauer folgende LD₅₀ Druckwerte bei 5 msec Dekompressionszeit:

Dekompression: sofort	2,17 atü
„ : nach 3 Std	2,99 „
„ : nach 7 „	2,56 „

Die LD₅₀ Druckwerte untereinander zeigen in dem untersuchten Bereich keinen signifikanten Unterschied, d. h. nicht die Zeit der Druckexposition und nicht die Druckhöhe, sondern die Dekompressionszeit ist der wesentliche Faktor. Die abdominale Temperaturmessung bei den Unterdruck-dekomprimierten neugeborenen Ratten ergab im Verlauf von 60 sec Temperaturabnahmen bis maximal 0,5° C, wobei allerdings Temperaturänderungen die schneller als in $\frac{1}{10}$ sec ablaufen mit der verwendeten Apparaturs nicht registriert werden konnten. Für die expl. Dkp. auf Unterdruck von ausgewachsenen Tieren stand keine geeignet große Anlage zur Verfügung.

Autopsisch ergab sich folgender Befund:

Die Tiere, die sofort nach dem Erreichen des erhöhten Druckes wieder experimentell dekomprimiert wurden, zeigten: äußerlich keine Verletzungen; im Darm vereinzelt kleine Hämorrhagien, in den Gefäßen vereinzelt Gasblasen; Leber und Nieren ohne makroskopisch erkennbare Veränderungen; Lunge teilweise hämorrhagisch infarziert, teilweise ödematös gebläht, kein freies Blut im Thorax; am Herzen subepikardiale Blutungen, im re. Herzrohr vereinzelt Gasblasen; am Schädel bei einigen Tieren subperiostale Blutungen über der Calvaria, blutiger Schaum vor der Nasenöffnung, aber keine auffallenden Blutungen aus dem Gehörgang. Histologisch findet sich im Herzen, in den Nieren und in der Leber Blut extravasal, sowie eine schaumige Auflockerung der Plasmastruktur bei intakten Zellkernen. Die Myofibrillen im Herzen zeigen teilweise Fragmentation, die Nierenkanälchen sind mit Erythrocyten gefüllt.

Die Tiere, die 3 bzw. 7 Std auf erhöhtem Druck gehalten worden waren, hatten reichlich Gasblasen in den Blutgefäßen, ausgeprägte hämorrhagische Infarzierung der gesamten Lunge und freies Blut im Thorax. Makroskopisch und mikroskopisch sind die hier dominierenden Veränderungen vielfach in der Literatur der Caisson-Krankheit beschrieben, eine detaillierte Aufzählung erübrigt sich. Auf einen Befund an den Ganglienzellen im Rückenmark soll aber besonders hingewiesen werden, weil er eine autochthone Gasentstehung im Gewebe sehr wahrscheinlich macht, wie sie für die Caisson-Krankheit bzw. auch die Druckfallkrankheit im Unterdruck als primär schädigender Faktor angenommen werden muß.

(Die Begutachtungen hat in liebenswürdiger Weise Herr Dozent Dr. BEJDL vom Wiener Histologischen Institut vorgenommen.)

Die Ganglienzellen von Überdruck-dekomprimierten Tieren zeigen mit fließenden Übergängen Veränderungen, die sich folgendermaßen charakterisieren lassen:

1. Homogenisierung des Kernes (zum Teil stärker, zum Teil schwächer anfärbbar). Wolkige Verklumpungen des Plasma, eine Neurofibrillenstruktur ist nicht mehr erkennbar. Die Zelle schrumpft (Kern-Plasmarelation verschiebt sich zu Gunsten des Kernes), möglicherweise handelt es sich dabei auch um ein Zusammendrücken der Zelle von außen.

2. Die Färbbarkeit der Zelle nimmt ab, im Plasma bildet sich eine netzartige Struktur aus (Verklumpung der Neurofibrillen?). Im Plasma treten kleine Vacuolen auf. Die Zellgrenze ist nicht mehr erkennbar, möglicherweise durch Aufreißen der Zellgrenzfläche. Verringerung des Cytoplasma bis zum vollständigen Schwund, dieser Vorgang kann durch Dehydratisierung bedingt sein. Die Kernstruktur bleibt am längsten erhalten, die Kernzerstörung scheint somit der chronologisch letzte Vorgang zu sein.

Diskussion.

Als Todesursache bei der expl. Dkp. muß die Schädigung durch die Explosionsdruckwelle bzw. die Explosionssaugwelle angenommen werden (auf die Möglichkeit einer derartigen Schädigung wurde zuerst von LATNER hingewiesen). Solche Druckwellenschädigungen wurden in der Nähe von Detonationen besonders im Krieg beobachtet und tragen in der englischen Literatur die Bezeichnung „blast injury“. Nach GROSSE-BROCKHOFF kommt es durch die Druckwelle zum Schock und zur Comotio cordis, also zu Effekten, welche mit relativ geringgradigen Organbefunden einhergehen. Schädigungen wie sie einem „crushing“, d. h. ausgedehnten Zerquetschungen, folgen, mögen mitbeteiligt sein.

Zu den bisher in der Literatur diskutierten Todesursachen bei der expl. Dkp. ist im einzelnen auszuführen:

1. Anoxie (HITCHOCK, COREY, GELFAN, COLE): Die Anoxie ist als Todesursache in den mitgeteilten Versuchen nicht als primär letaler Faktor möglich; die Versuchstiere befanden sich immer in einer Atmosphäre, die Sauerstoff in genügender Menge enthält, die Dekompression erfolgt auf Normaldruck (d. h. einen ausreichenden Sauerstoffpartialdruck). Inwieweit die Anoxie sekundär als Spätfolge der Lungenveränderungen Bedeutung hat, muß hier nicht berücksichtigt werden.

2. Gasembolie (KILCHES, EGGLETON, COREY): Die Gasembolie tritt in den Überdruck-Dekompressionsversuchen immer auf, d. h. bei jeder Dekompression von Überdruck auf Normaldruck wird der Partialdruck der einzelnen Gase erniedrigt und damit die Möglichkeit gegeben, daß aus dem übersättigten Zustand Gas frei wird. Die Gasabsorption im Körper wird um so größer sein, je länger die Exposition dauerte (nach 6—7 Std wird allerdings eine nahezu maximale Sättigung erreicht [BEHNKE u. Mitarb.]) und je höher der Druck war. In den mitgeteilten Versuchen war aber die Druckexposition, und bis zu einem gewissen Grade auch die Druckhöhe, auf den nach der Dekompression eintretenden Tod ohne Einfluß. Tiere, die 4 atü ausgesetzt waren (innerhalb von 10 sec wurde dieser Druck erreicht) und sofort explosiv dekomprimiert wurden, sind in demselben Prozentsatz tot wie Tiere, die 3 oder 7 Std dem erhöhten Druck ausgesetzt worden waren. Wenn andererseits Tiere, die auf 4 atü gebracht wurden, sofort in 1,5 sec dekomprimiert werden, überleben alle und es tritt auch keine Spätschädigung ein. Tiere, die 4 atü (im Prinzip gilt dasselbe auch für die anderen Drucke) 3 oder 7 Std ausgesetzt waren und dann innerhalb 1,5 sec dekomprimiert wurden, überleben alle unmittelbar; später, aber mit einer Latenz von mindestens 5 min, beginnen sich bei einem Teil der Tiere die Symptome der Caisson-Krankheit zu manifestieren: Ataxie, Gleichgewichtsstörungen, Drehbewegungen um die Längsachse, Krämpfe, Blutungen aus der Nase und ein Teil der Tiere stirbt (siehe Tabelle). Es ergibt sich somit als Unterschied zwischen Dekompression und expl. Dkpl. im engeren Sinne: bei 4 atü sterben nach expl. Dkp. (in 5 msec) alle Tiere unmittelbar nach der Dekompression, bei 4 atü und Dekompression in 1,5 sec stirbt kein Tier unmittelbar, wohl

aber innerhalb von Stunden ein bestimmter Prozentsatz der Tiere an den Folgen der Gasembolie. Als Spätschädigungen können dann auch bleibende Lähmungen beobachtet werden.

3. Autochthone Gasentbindung (GERBIS, SCHUBERT): Eine autochthone Gasentbindung ist als Todesursache — abgesehen davon (siehe unten), daß sie nicht durch Abkühlung zum Tode führt — denkbar, indem sie durch intracelluläre Schädigungen (Zellmembranzerstörungen) die Zellfunktion ausschaltet, doch läuft die Druckschwellenschädigung zeitlich der autochthonen Gasentbindung voraus (Druckschwellenschädigung in Bruchteilen von msec, autochthone Gasentbindung mit einer Latenz von etwa 1 sec). Die autochthone Gasentbindung scheidet andererseits als Todesursache aus, da sich aus der Überdruckdekompensation von 4 atü (sofortige Dekompensation) ergibt: In der kurzen Zeit der Exposition (weniger als 10 sec) kann die Gasabsorption nur minimal sein (BEHNKE und WILLMON) und trotzdem sind die Tiere nach der expl. Dkp. tot, wobei die Dekompensation auf Normaldruck (den 10 sec vorher verlassenen Zustand) erfolgt. Das „Auf-Druck-Bringen“ für sich ist nicht tödlich, da gleich schnelles Auf-Druck-Bringen und nachfolgende Dekompensation in 1,5 sec vertragen werden.

4. Erhöhung des Schädelinnendruckes (HELM): Eine Erhöhung desselben ist möglich und wahrscheinlich, nur schwer zu registrieren, weil sie (sofern sie als Todesursache in Betracht kommt) durch die Explosionsdruckwelle bedingt ist und daher nur äußerst kurze Zeit anhält. Die von HELM gemessene Schädelinnendruck-erhöhung ist sekundär und als primäre Todesursache bei der expl. Dkp. abzulehnen.

5. Temperatur: Bei der expl. Dkp. sinkt die Temperatur im Raum um den dekomprimierten Körper durch Gasausdehnung beträchtlich (HABER). Eine Gasblasenentstehung im Organismus müßte, wenn sie adiabatisch erfolgte, auch zu einer Abkühlung führen. Wenn aber die Abkühlung bis auf 24° C geht, ist dies mit dem Leben nicht mehr vereinbar. Die Gasblasenbildung aus Blut *in vitro* im Unterdruck bei 50 mm Hg, also über der Wasserdampfspannung, tritt mit einer Latenz von etwas weniger als 1 sec ein, dies scheint ein analoger Vorgang wie der Siedeverzug zu sein. Auch bei der autochthonen Gasentstehung kann ein „Siedeverzug“ auftreten. Eine Temperaturänderung ist daher nicht eher als nach etwa 1 sec zu erwarten. Bei der mitgeteilten Temperaturmessung mit Thermoelementen im Abdomen (einige Versuche auch mit Thermonadeln im Cerebrum) ergab sich eine Temperaturänderung innerhalb von 60 sec mit einer Abnahme der Temperatur um 0,5° C. Diese Temperaturabnahme ist, auch unter Berücksichtigung der großen Wärmekapazität und des guten Leitvermögens im Organismus, sicher zu gering, um daraus auf eine der Messung mit der verwendeten Apparatur nicht mehr möglichen, kurzzeitigen, devitalisierenden Temperaturänderung rückschließen zu können. Erfolgte aber die Temperaturänderung langsamer als in 0,1 sec, so wäre sie meßbar gewesen. Eine Temperaturabnahme bis auf 24° C im Gehirn und Bauchraum von neugeborenen Ratten bei expl. Dkp. ist daher nicht möglich und als Todesursache abzulehnen.

Die explosive Überdruckdekompensation hat gegenüber der explosiven Unterdruckdekompensation einige experimentelle Vorteile. Zu diesem Schluß kam auch COREY (1949), doch ist in seinen Versuchen dem Zeitfaktor bei der expl. Überdruckdekompensation zu wenig Beachtung gegeben, daher kommt COREY zu dem Schluß, daß die Aeroembolie und die Anoxie die letalen Faktoren seien. Die Vorteile der expl. Überdruckdekompensation sind: 1. keine Anoxieschädigung, 2. relativ einfache Apparatur, 3. keine Rekompensation; der durch die Dekompensation gesetzte Zustand ist bei Normaldruck stationär, daher kann das Tier leicht seziert und

histologisch verarbeitet werden. Eine morphologische Zustandsänderung im Unterdruck dagegen wird durch die Rekompession verändert.

Nicht die Druckabnahme, sondern die Zeit (und bis zu einem gewissen Grad wahrscheinlich auch die Druckkammerform) sind die bestimmenden Faktoren bei der Schädigung durch expl. Dkp. Die von STICKNEY und NORTHUP mit einer großen Apparatur durchgeführten explosiven Dekompressionen auf Unterdruck sind vergleichsweise sehr aufschlußreich, nur nehmen die Autoren a priori an, daß das Ausmaß der Druckabnahme der bestimmende Faktor sei und untergliedern dementsprechend ihre Gruppen zu wenig in kürzere Dekompressionszeiten; eine Erweiterung ihrer Versuche ist dringend notwendig.

Bei der expl. Dkp. auf Unterdruck könnte die Ausbreitung der Explosionswelle in der verdünnten Luft gehemmt sein, doch ergibt sich nach den Messungen von CLEMEDSON, daß die Explosionswelle schon in Bruchteilen von Millisekunden abgelaufen ist, d. h. die Auswirkung der Druckwelle lange vor Erreichen des Unterdruckes stattgefunden hat.

Bei STICKNEYS Befunden wäre auch daran zu denken, daß erst die Rekompessionswelle zu einer Schädigung ähnlich der Druckwellenschädigung bei Dekompression geführt hat; genaue Angaben über die Rekompessionszeit fehlen und die Dekompressionszeiten sind zum größten Teil für eine echte explosive Dekompression zu lang.

Die bei der expl. Dkp. auftretenden Schädigungen sind durch die bisher bei der Dekompression versuchten Vorbeugungsmaßnahmen (rasche Rekompession, Bandagen um den Thorax, Sauerstoffvoratmung) nicht zu beeinflussen. Maßnahmen gegen die Folgen einer expl. Dkp. müßten sich auf die Absorption der Explosionswelle im Inneren des Druckkörpers richten.

Zusammenfassung.

Die Begriffe Dekompression und explosive Dekompression sind zu trennen, wobei mit expl. Dkp. nur solche Änderungen des Druckes um den Körper bezeichnet werden sollen, bei denen es zu Schädigungen durch die Explosionsdruckwelle bzw. durch die Explosionssaugwelle kommt. Größenordnungsmäßig muß die Dekompression in wenigen Millisekunden erfolgen. Die Todesursache ist die Explosionsdruckwelle. Die Schädigungen gleichen demnach denen wie sie unter der Einwirkung von Detonationswellen gesehen werden. Ein gradueller Unterschied zwischen der Auswirkung einer Explosionsdruckwelle und einer Explosionssaugwelle ist möglich. Der Tod bei der expl. Dkp. ist ein Schocktod, die Organveränderungen sind für die Erklärung mit einer anderen Todesursache zu gering. Vorbeugungsmaßnahmen gegen die Auswirkung einer Explosionsdruckwelle müssen sich auf die Absorption dieser Druckwelle in der Druckkammer richten.

Literatur.

- CLEMEDSON, C. J.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **18**, Suppl. **61** (1949). — COLE, C. R.: J. Appl. Physiol. **6**, 96 (1953). — COREY, E. L.: Amer. J. Physiol. **150**, 607 (1947); **157**, 88 (1949). — EDELMANN, A., W. V. WHITEHORN, A. LEIN and F. A. HITCHCOCK: J. Aviation Med. **17**, 596 (1946). — EGGLETON, P., S. R. ELSDEN, J. FEGLER and C. O. HEBB: J. of Physiol. **104**, 129 (1945). — GELFAN, S., L. F. NIMS and R. B. LIVINGSTON: Amer. J. Physiol. **162**, 37 (1950). — GERBIS, H.: Dtsch. med. Wschr. **1939**, II, 1152. — GROSSE-BROCKHOFF, F.: Hdbch. f. inn. Med. (BERGMANN u. SCHWIEGK) VI/2, Springer 1954. — HABER, F.: J. Aviation Med. **21**, 495 (1950). — HALL, W. M., and E. L. COREY: Amer. J. Physiol. **160**, 361 (1950). — HELM, W.: J. Aeronaut. Sci. **5**, 189 (1938). — HORNBERGER, W., u. TH. BENZINGER: Luftfahrtmed. **7**, 9 (1943). — KEMPH, J. P., and F. A. HITCHCOCK: Amer. J. Physiol. **168**, 592 (1952). — KILCHES, R.: Luftfahrtmed. **7**, 35 (1943). — LATNER, A. L.: Lancet **1942**, 303. — SCHUBERT, G., u. A. GRÜNER: Klin. Wschr. **1939**, 988. — SCHUBERT, W.: Virchows Arch. **324**, 563 (1954). — SHAW, L. A., A. R. BEHNKE, A. C. MESSER, R. M. THOMSON and E. P. MOTLEY: Amer. J. Physiol. **112**, 545 (1935). — STICKNEY, J. C., and D. W. NORTHUP: Amer. J. Physiol. **172**, 347 (1953).

Dr. H. KOLDER, Wien/Österreich, Physiol. Inst. d. Univ.

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. H. HELLNER).

Papierchromatographischer Nachweis von Conteben.

Von

K. HINRICHS, H. POPPE, H. STEYER und H. WEIDEMANN.

(Eingegangen am 30. Juli 1954.)

Bei Untersuchungen der Verteilung eines radioaktiv etikettierten Conteben (4-Acetyl-amino-Benzaldehyd-Thiosemicarbazons) im Organismus^{1, 2, 3, 4} ergab sich die Notwendigkeit eines papierchromatographischen Nachweises. In der uns zugänglichen Literatur fand sich eine entsprechende Methode nicht. Im folgenden wird daher das von uns geübte Verfahren wiedergegeben:

Conteben wird in siedendem 96%igen Äthylalkohol gelöst und einige Tropfen dieser Lösung werden in der Wärme auf den Papierstreifen gebracht. Nach Trocknen der Streifen schwanken bei eindimensionaler absteigender Chromatographie mit dem Lösungsmittel 30 cm³ Butanol + 20 cm³ Eisessig + 40 cm³ Wasser die R_F-Werte zwischen 0,72 und 0,84 (26 Chromatogramme); Mittelwert 0,80.

Nach einer Laufzeit von ungefähr 24 Std Trocknen der Streifen an der Luft. Das Conteben wird mit Hilfe eines Färbeverfahrens auf dem Papier sichtbar gemacht. Es bildet eine tropfenförmige Figur mit der Spitze nach oben. Die Front des Stoffes ist klar zu erkennen. Das Färbeverfahren beruht auf Abspaltung des Essigsäurerestes durch Behandlung des rückbleibenden aromatischen Amins mit Natriumnitrit-Lösung und Kuppeln der diazotierten Verbindung mit Phenyl- α -Naphthylamin zu einem blauen Azofarbstoff.

Einzelheiten des Verfahrens:

1. Besprühen des Streifens mit 20%iger HCl.
2. Trocknen bei 50—70 °C.
3. Abkühlen im Eisschrank.
4. Besprühen mit 0,2%iger Na-Nitrit-Lösung + 0,4%iger HCl im Mischungsverhältnis 1 : 1 (stets *frisch* gemischt!).
5. Besprühen des noch feuchten Streifens mit einer 0,3%igen Lösung von Phenyl- α -Naphthylamin in Methylalkohol.
6. Lufttrocknen.

Diese Methode des Conteben-Nachweises ist dann besonders nützlich, wenn die Reinigung eines Conteben enthaltenden Extraktes bis zur Reinsubstanz auf Schwierigkeiten stößt.

So genügte das folgende einfache Reinigungsverfahren bei Organen von Säugtieren, denen das Conteben auf dem Blutweg zugeführt war, um einen sicheren Conteben-Nachweis zu führen (es ergaben sich die gleichen R_F-Werte wie bei Lösungen von reinem Conteben in Alkohol): Extraktion der zerkleinerten Organe im Soxhlet mit Äthylalkohol für 2—3 Tage. Abdampfen des Alkohols bis zur Trockne. Mehrmaliges Ausschütteln des in Wasser aufgenommenen Rückstandes mit Äther.

Nach dem Absetzen jeweils vorsichtiges Dekantieren des Äthers in ein Zentrifugenröhrchen bis auf einen kleinen Rest. Zentrifugieren. Abdekantieren des Äthers, der einen großen Teil der Verunreinigungen gelöst enthält. Der Zentrifugierückstand wird mit einer kleinen Menge reinen Äthers in den Hauptkolben zurückgeschwemmt. Abdampfen des Äthers bis zur Trockne. Kochen des Rückstandes für etwa 10 min mit 96%igem Äthylalkohol unter Rückfluß und Aufbringen einiger Tropfen auf Papier, Papierchromatographie.

Zusammenfassung.

Es wird ein papierchromatographisches Nachweisverfahren für Conteben und ein Verfahren zum Nachweis von Conteben in Organen beschrieben.

Literatur.

¹ HINRICHS, K., H. POPPE u. H. STEYER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **218**, 193 (1953). — ² HINRICHS, K., H. POPPE u. H. STEYER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **221**, 6 (1954). — ³ HINRICHS, K., H. POPPE, H. STEYER u. H. WEIDEMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. (im Druck). — ⁴ HINRICHS, K., H. POPPE, H. STEYER u. H. WEIDEMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. (im Druck).

Priv.-Doz. Dr. K. HINRICHS, z. Zt. Wilhelmshaven, Städt. Krankenanstalten.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G. Berlin-West.

Die Verteilung von Inulin und Dextran auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.

IV. Mitteilung.

Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung.

Von

HEDWIG LANGECKER.

(Eingegangen am 23. August 1954.)

Unsere Untersuchungen über die Dynamik von Verteilungsvorgängen mit nicht reaktiven Modellsubstanzen aus der Sulfonamidreihe und mit Hexamethylentetramin hatten ergeben, daß nach beendeter Durchmischung der Körpersäfte das Eindringen in leicht zugängliche Räume (Pericardraum) und gut durchgeblutete Gewebe in 20 min beendet ist (LANGECKER 1—3). Im weiteren Verlauf werden schwerzugängliche Räume (Subarachnoidalraum, Augenvorderkammer) und schlecht durchblutete Gewebe besetzt. Das Eindringen erfolgt hier langsamer als in die leicht zugänglichen Interzellular- und Zellräume teils wegen der längeren Diffusionswege, teils wegen eines Membranwiderstandes. Das Letztere gilt besonders für Anionen und Kationen, bei denen sich das Sperrgitter der Membran bevorzugt auswirkt. Dementsprechend trifft das nahezu undissoziierte Sulfanilamid bei seiner Verteilung auf keinen Membranwiderstand. Auch das Verhältnis von Endothelfläche zu Flüssigkeitsvolumen kann gleichfalls für Unterschiede in der Durchlässigkeit der Capillarendothelien Bedeutung haben. Da neben Potential und Vorzeichen der Ladung auch Größe und Gestalt des Moleküls für die Verteilungsvorgänge maßgebend sein werden, wurde in der folgenden Arbeit die Verteilung von Nichtelektrolyten verschiedener Molekulargrößen: Inulin und Dextran untersucht.

Inulin I.

Bezüglich der Methoden hinsichtl. der Verteilungsversuche in vitro und in vivo beim nierenlosen Hund vgl. Mitteilung I und II. Die Tiere erhielten 100 mg/kg Inulin (purissimum, pyrogenfrei, Deutsche Laevosangesellschaft Böhlinger) i.v. in 2%iger Lösung. Die Bestimmung erfolgte nach der Methode von LITTLE, bei der die Glucose durch Autooxydation in alkalischer Lösung zerstört wird.

In Tab. 1 ist die Verteilung von I auf die Phasen des Blutes dargestellt. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, die denen der in vivo-Versuche entsprachen. (Je 5 Versuche in 5 verschiedenen Konzentrationen.) Es ergibt sich eine ganz überwiegende Verteilung von I zu-

Tabelle 1. Die Verteilung von Inulin auf die Phasen des Hundebutes in vitro.

mg% im Blut	% der Gesamtmenge Erythrocyten		Plasma	
	Wasser	Eiweiß	Eiweiß	Wasser
20,7	8,8	—	12,9	79,0
42,6	12,2	—	17,2	71,0
62,5	6,25	—	27,5	66,3
83,4	10,8	—	22,2	64,5
103,0	8,7	—	29,4	63,2

gunsten der Wasserphase. Die Adsorption an Plasmaeiweißkörper ist sehr gering und an Erythrocyteneiweiß gleich null.

In Tab. 2 sind der Blutkonzentrationsabfall sowie die Konzentrationen in Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit dargestellt. Das Verteilungsgleichgewicht ist nach 2 Std mit einem Verteilungsvolumen von 30% Körpergewicht erreicht. Im Liquor wird zu dieser Zeit

Tabelle 2. Die Verteilung von Inulin beim nierenlosen Hund nach i.v. Verabreichung von 100 mg/kg (mg%). In Klammern: Zahl der Versuche.

Zeit	20	ε	50	ε	120	ε	240	ε
Blut . . .	55,0 (5)	±2,73	40,0 (6)	±2,92	31,6 (6)	±2,62	30,6 (4)	±2,69
Plasma . . .	97,0 (5)	±6,31	74,6 (5)	±5,39	58,7 (5)	±2,97	55,7 (3)	±3,04
Liquor . . .			0,83 (1)		2,2 (1)		1,45 (2)	±0,1
Kammerwasser . . .	3,6 (1)		1,29 (1)		3,2 (1)		3,42 (2)	±2,17
Pericardflüssigkeit .					33,6 (1)		30,4 (3)	±1,15
Vert. Vol.								
% K.gew. .	14,7		21,1		30,6			

knapp $\frac{1}{15}$ der Blutkonzentration gefunden, im Kammerwasser $\frac{1}{10}$. Die Konzentration der Pericardflüssigkeit entspricht der Blutkonzentration. I dringt demnach rasch in den Pericardraum ein, hingegen sehr langsam in Subarachnoidalraum und Augenvorderkammer. Man muß daher hier mit einem Membranwiderstand gegenüber I rechnen, während das Pericardendothel gut durchlässig ist.

I gehört zu den nicht reaktiven Stoffen, für die ausschließlich extracelluläre Verteilung angenommen wird. Das erreichte Verteilungsvolumen von 30% entspricht dieser Annahme (KRÜHOFER, GREGERSEN, EICHLER,

BLOODWORTH, GAUDINO). Da solche Stoffe in der interstitiellen Flüssigkeit in Plasma-Ultrafiltratkonzentration vorliegen, wurde das Verteilungsvolumen auch auf der Basis der Ultrafiltratkonzentration errechnet. Dabei ergibt sich für I ein Wert von 20% Körpergewicht (und für Sulfanilsäure von 26%). RAISZ ermittelte in Infusionsversuchen mit I beim Hund ein Verteilungsvolumen von 16—19%.

Der Nichtelektrolyt Inulin — nach K. MEYER hat das Dahlienknollen-Inulin ein Molekulargewicht von 3000—5000 — durchdringt die Capillarwand. Die Glomerulusendothelien sind für I durchlässig, denn es wird rasch und quantitativ durch Glomerulusfiltration ausgeschieden. I passiert die Zellwand nicht. Nach KRÜHOFFER erscheint beim Kaninchen I nicht in der Galle, was dafür spricht, daß es nicht in die Leberzellen eindringt. Der geringe im Erythrocytenwasser nachgewiesene Anteil bedeutet keinen Widerspruch, da ja an den Blutphasen in vitro ermittelte Verteilungsbefunde nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse anderer Zellgrenzflächen übertragen werden dürfen und Adsorption an der Erythrocytenoberfläche das Bild verwischen kann. Auch bei der Sulfanilsäure ergab sich eine ähnliche Diskrepanz. Die Inhomogenität des Inulinmoleküls läßt an die Möglichkeit verschiedener Verteilungsgeschwindigkeiten kleinerer und größerer Inulinmoleküle denken. Die Analysenmethode mißt jedoch nur das alkalistabile Polysaccharid und schließt kleinere alkalilabile Anteile aus.

COTLOVE hat in Untersuchungen über Mechanismus und Ausmaß der Verteilung von I im Chloridraum der Gewebe mit Infusionstechnik bei der Ratte zeigen können, daß in den ersten zwei Stunden $\frac{4}{5}$ des Chloridraumes besetzt werden und daß sich die Verteilung in schwer zugängliche Räume und schlecht durchblutete Gewebe noch über 50 Std hin erstreckt. Die für freie Diffusion zur Verfügung stehende Fläche in der Capillarwand nimmt mit zunehmender Molekulargröße progressiv ab (PAPPENHEIMER). Es wird demnach bei I der Verteilungsvorgang von der Durchlässigkeit der Capillarendothelien und von Membranwiderständen bestimmt, zum Unterschied von ionisierten Verbindungen erfolgt jedoch die Verteilung langsamer. Das nach 120 min erreichte Verteilungsvolumen von 30% Körpergewicht entspricht dem bei der Sulfanilsäure ermittelten [LANGECKER (1)], die Geschwindigkeit der Verteilung auf leicht zugängliche Räume ist jedoch bei Sulfanilsäure größer als bei I, denn es werden von Sulfanilsäure schon in 20 min 70% des leicht zugänglichen Raumes besetzt, beim I dagegen nur 48,5% und erst nach 50 min 70%. Auch GAUDINO fand beim Hund nach I-Infusion erst zwischen der 1. und 2. Std das Verteilungsgleichgewicht erreicht. Nach dem FICKschen Diffusionsgesetz müßte die Diffusionsgeschwindigkeit von I 5 mal kleiner sein als die der Sulfanilsäure. (Dies gilt ohne Berücksichtigung verschiedener Molekülgestalt und Solvation.) Da die beobachteten Unterschiede aber

geringer sind, muß man für die Sulfanilsäurediffusion den elektrischen Widerstand als maßgebend ansehen.

I bevorzugt die extracelluläre Verteilung, wird kaum adsorbiert, besetzt vorwiegend den extracellulären Wasserraum, während der intracelluläre Wasserraum schlecht erreichbar ist.

Dextran (II).

Methode. Hinsichtlich der Verteilung in vitro und in vivo vgl. Mitteilung I u. II. Die Hunde erhielten 100, 200, 400 mg/kg i.v. Macrodex, Knoll, 6% ige kolloidale Lösung von depolymerisiertem Dextran, einem homeopolaren, verzweigten Polysaccharid mit Glucose als Grundbaustein.

Die Bestimmung erfolgte nach BLOOM, wobei durch Alkoholfällung eine Trennung von kleinen Kohlenhydratmolekülen erreicht wird.

Tabelle 3. Verteilung von Dextran auf die Phasen des Hundeblutes in vitro.

mg% im Blut	% der Gesamtmenge Erythrocyten		Plasma	
	Wasser	Eiweiß	Eiweiß	Wasser
50	0,0	0,0	66,3	36,3
100	8,9	4,7	61,7	24,5
200	6,3	4,7	71,5	17,5
400	5,2	8,9	80,6	14,1
800	4,9	10,5	71,5	13,0

Aus Tab. 3 ist die Verteilung von II in verschiedenen Konzentrationen auf die Blutphasen dargestellt. (Je 5 Versuche in 5 verschiedenen Konzentrationen.) II ist fast ausschließlich im Plasma anzutreffen. Der ultrafiltrable Anteil nimmt mit höheren Konzentrationen ab. Auch bei der Ultrafiltration reiner II-Lösungen (50, 100, 200, 400 mg%) erwiesen sich nur $\frac{2}{3}$ ultrafiltrierbar.

Die Molekülgröße von II ist nicht einheitlich, für die kleinsten Moleküle nimmt man ein Molekulargewicht von 36000 an. Wahrscheinlich sind diese ultrafiltrabel. Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, daß bei II-Infusionen etwa $\frac{1}{3}$ aller Moleküle die Blutbahn im Lauf der ersten 5—6 Std durch renale Ausscheidung verläßt (GRÖNWALL). Nach GIEBISCH hängt das Auftreten von Dextran im extravasculären Raum von Molekulargewicht ab.

In Tab. 4 ist der Blutkonzentrationsabfall sowie die Konzentrationen in Liquor, Kammerwasser und Perikardraum dargestellt. Das Verteilungsgleichgewicht ist nach 5 Std erreicht und beträgt 8—10% des Körpergewichtes. Die in Liquor und Kammerwasser erscheinenden ganz geringfügigen Konzentrationen sind nicht mehr exakt feststellbar und betragen $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{200}$, in der Perikardflüssigkeit $\frac{1}{10}$ der Blutkonzentration. Wahrscheinlich sind diese II-Spuren kleinmolekulige Anteile. Das transudatbildende Endothel des Perikardraumes ist gegenüber II-Molekülen schwer

passierbar. Nach VARA wird auch die Plazentarschranke von II nicht durchdrungen. Das in 5 Std erreichte kleine Verteilungsvolumen besagt, daß nur zum kleinsten Teil II den extravascularen Raum besetzt, was auch mit Angaben von BOLLMANN beim Kaninchen übereinstimmt. Nach Versuchen von WASSERMANN an Hunden mit II-Infusionen dringt II langsamer in das Interstitium ein als Eiweiß, was seine gute Brauchbarkeit als Plasma-Eiweißersatzmittel begründet. Das große Molekül des II

Tabelle 4. Die Verteilung von Dextran beim nierenlosen Hund nach i.v. Verabreichung (mg%). In Klammern: Zahl der Versuche.

	Zeit	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Blut	2 min	187 $\pm$ 5,66 (2)	274 (1)	684 $\pm$ 0,00 (2)
Blut	10 min	171 $\pm$ 2,12 (2)	254 (1)	617 $\pm$ 16,91 (2)
Blut	30 min	164 $\pm$ 2,12 (2)	227 (1)	560 $\pm$ 7,07 (2)
Blut	50 min	153 $\pm$ 2,83 (2)	227 (1)	533 $\pm$ 11,31 (2)
Blut	90 min	143 $\pm$ 2,83 (2)	217 (1)	508 $\pm$ 11,31 (2)
Blut	2 Std	137 $\pm$ 3,53 (2)	218 (1)	493 $\pm$ 41,10 (2)
Blut	3 Std	129 $\pm$ 0,22 (2)	212 (1)	460 $\pm$ 14,14 (2)
Blut	4 Std	117 $\pm$ 2,83 (2)	195 (1)	423 $\pm$ 2,83 (2)
Blut	5 Std	128 (1)	190 (1)	404 $\pm$ 16,97 (2)
Liquor	Stunden	ca. 5 (1)	ca. 4 (1)	ca. 3 $\pm$ 2,83 (2)
Kammerwasser .	Stunden	ca. 5 (2)	ca. 4 (1)	ca. 2 $\pm$ 1,41 (2)
Perikard	Stunden	13 $\pm$ 8,49 (2)	20,8 (1)	23,2 $\pm$ (1)
Vert.-Volum.				
% Körpergew. .	Stunden	7,8 (1)	10,5 (1)	9,9 $\pm$ 4,25 (2)

wird lange Zeit im Blut festgehalten, ein Abbau, wie er von TERRY in der Leber nachgewiesen werden konnte, spielt für unsere kurzfristigen Versuche keine Rolle.

Es verhält sich demnach das große neutrale Molekül des Inulins gegenüber Capillarendothelien, Perikardendotel, der Liquor- und Kammerwasserschranke so wie ionisierte Verbindungen, nur erfolgt die Verteilung langsamer. Daß Zellgrenzen nicht überschritten werden, stimmt mit der von der Darmresorption her bekannten Tatsache überein, daß nicht spaltbare große Moleküle auch nicht resorbiert werden bzw. hochmolekulare Verbindungen der Nahrung im Magen-Darmtrakt gespalten werden. Für die großmolekuligen Anteile des II sind auch die Capillarendothelien so gut wie undurchlässig. An dem Modell des nierenlosen Hundes läßt sich demnach der Einfluß der Molekülgröße auf die Endotheldurchlässigkeit gut nachweisen.

Zusammenfassung.

Es wird die Verteilung von Inulin (I) und Dextran (II) auf die Phasen des Hundeblutes in vitro untersucht und am nierenlosen Hund der Konzentrationsablauf in Blut, Kammerwasser, Liquor und Perikardflüssigkeit ermittelt. I bevorzugt die extracelluläre Verteilung, wird kaum

adsorbiert und erreicht ein Verteilungsvolumen von 30% Körpergewicht. II ist infolge mangelnder Ultrafiltrierbarkeit bevorzugt im Plasma verteilt und erreicht nur ein sehr kleines Verteilungsvolumen. Der extravasculäre Raum wird kaum besetzt. Die Versuche zeigen die Bedeutung der Molekülgröße für Verteilungsvorgänge.

Frau D. BREITKREUZ, Herr E. BUCHWALD und Frä. U. STRAUCH haben bei der Durchführung der Versuche wertvolle Hilfe geleistet.

Literatur.

- BLOODWORTH, J. M. B.: *Endocrinology* (Springfield, Ill.) **50**, 174 (1952). — BLOOM, M. L., and M. L. WILLCOX: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **76**, 3 (1951). — BOLLMAN, J. L.: *J. Labor a. Clin. Med.* **41**, 421 (1953). — COTLOVE, E.: *Amer. J. Physiol.* **176**, 396 (1954). — EICHLER, O., u. I. APPEL: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **212**, 472 (1951). — GAUDINO, M., I. L. SCHWARTZ and M. F. LEVITT: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **68**, 507 (1948). — GREGERSEN, M. I., and J. D. STEWART: *Amer. J. Physiol.* **125**, 142 (1939). — GRÖNWALL, A., u. B. INGELMAN: *Nord. Med.* **21**, 247 (1944). — KRÜHÖFFER, P.: *Acta physiol. scand. (Stockh.)* **11**, 16 (1946). — LANGECKER, H. (1): *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **218**, 278 (1953). — (2) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 160 (1954). — (3) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 166 (1954). — LIEBISCH, G., H. D. LANSON and R. F. PITTS: *Amer. J. Physiol.* **178**, 168 (1954). — LITTLE, J. M.: *J. of Biol. Chem.* **180**, 747 (1949). — MEYER, K. M.: *Makromolek. Chem.* Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest u. Portig KG 1950. — PAPPENHEIMER, I. R., E. M. RENKIN and L. M. BORRERO: *Amer. J. Physiol.* **167**, 13 (1951). — RAISZ, L. G., M. KENDALL, M. K. YOUNG jr. and I. T. STINSON: *Amer. J. Physiol.* **174**, 72 (1953). — TERRY, R., CH. L. YUILE: A. GOLODETZ, C. E. PHILIPS and R. R. WHITE: *J. Labor. a. Clin. Med.* **42**, 6 (1953). — VARA, P.: *Acta obstetr. scand. (Stockh.)* **30**, Suppl. 6 (1950). — WASSERMAN, K., and H. S. MAYERSON: *Amer. J. Physiol.* **171**, 218 (1952).

Frau Prof. Dr. H. LANGECKER, Berlin N 65, Müllerstr. 170/172.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Innsbruck
(Vorstand: Prof. Dr. A. HITTMAYER),
der Univ.-Kinderklinik Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. J. STRÖDER),
und dem Med.-chem. Institut der Universität Innsbruck
(Vorstand: Prof. Dr. R. STÖHR).

Vergleichende Untersuchung der Denaturierung sowie der Oxydation von fetalem und Erwachsenen-Oxy-Hämoglobin durch Kaliumchlorat.

II. Mitteilung: Untersuchungen zur Heinzkörper-Bildung in Neugeborenenerythrocyten.

Von

W. KÜNZER und D. SAFFER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juni 1954.)

Kaliumchlorat erzeugt Heinzkörper in *Nabelschnurerythrocyten* wesentlich rascher als in *Erwachsenenerythrocyten*⁹. Dies konnte gezeigt werden, indem Nabelschnur- und *Erwachsenenerythrocyten* unter gleichen Versuchsbedingungen mit dem Gift inkubiert wurden. Da es sich bei den Heinzkörpern allem Anschein nach um Denaturierungsprodukte des Hb-Eiweißanteiles an der Erythrocytenmembran handelt^{3,5}, entsteht die Frage, ob der Neugeborenenblutfarbstoff selbst die Wirkung des Chlorates begünstigt. Sollte dies zutreffen, dann müßte dem Blutgift gegenüber das *fetale* Oxy-Hb empfindlicher sein als das *Erwachsenen*-Oxy-Hb.

Auf Grund dieser Überlegungen vergleichen wir im folgenden die beiden Oxy-Hämoglobine in bezug auf die Chloratresistenz. Außerdem bestimmen wir die *Oxydationsgeschwindigkeit* von fetalem und reifem Hb nach Chlorateinwirkung. Und zwar deshalb, weil der Chloratdenaturierung des Blutfarbstoffes ein autokatalytischer Prozeß zugrunde liegt, dessen Ablauf von der Schnelligkeit der Hämoglobinbildung maßgeblich beeinflußt werden soll^{4,6}.

1. Zur Untersuchung der *Denaturierungsgeschwindigkeit* der beiden Oxy-Hämoglobine wurden Hämolsate aus gründlich gewaschenen Nabelschnur- bzw. *Erwachsenenerythrocyten* verwendet, die mittels Adsorption an Aluminiumhydroxyd² gereinigt waren. Dieses Verfahren vereinigt in zuverlässiger Weise die Entfernung von Stromata mit derjenigen von begleitenden Eiweißstoffen (Reste von Plasma-eiweißkörpern, Fermente wie Katalase, Carboanhydrase u. a.) und läßt kein Hämoglobin entstehen. Der Denaturierungsprozeß konnte deshalb verfolgt werden, weil sich das denaturierte Produkt — ähnlich wie bei der Alkalidenaturierung^{2,8} —

durch $\frac{1}{3}$ Sättigung mit Ammonsulfat ausfällen läßt. Nach genügend langer Einwirkungszeit des Chlorates auf den Blutfarbstoff unterbricht man den Reaktionsablauf, indem man 10%ige Kaliumcyanidlösung zusetzt, außerdem gibt man 1%ige Kaliumferricyanidlösung hinzu. Auf diese Weise wird alles im Ansatz befindliche Hämoglobin in Hämglobin und alles Hämglobin in Cyanhämglobin übergeführt. Da kein Katalysator mehr zur Verfügung steht, ist der Prozeß unterbrochen. Anschließend fügt man zu 1 Volumen Reaktionsflüssigkeit 2 Volumina einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung (unter dem Abzug), wodurch der denaturierte Blutfarbstoff ausfällt. Durch anschließende Filtration gewinnt man den noch unveränderten Farbstoff, der sofort mit dem Beckman-Spektrophotometer bei $544\text{ m}\mu$ vermessen wird. Der prozentuale Gehalt an nicht denaturiertem Hb kann ohne weiteres durch Bezug der Extinktion der Endlösung auf

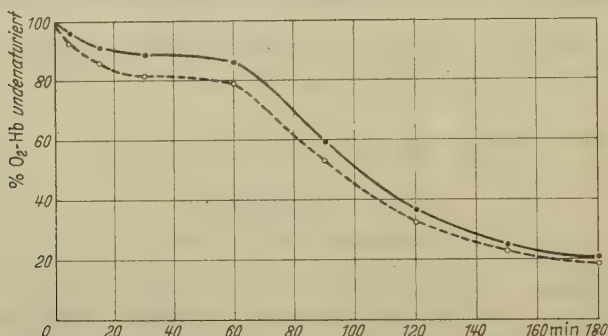


Abb. 1. Denaturierung von Oxyhämoglobin durch Kaliumchlorid im Ablauf der Zeit bei p_H 6,0. — = Nabelschnur-Hb, - - - = Erwachsenen-Hb. Blutfarbstoff = $5,78 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter; $KClO_3$ = $5,45 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Phosphatpuffer $1,8 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Temperatur 30°C .

diejenige der Ausgangslösung (als Cyanhämglobin gemessen!) errechnet werden. Die Denaturierung wurde in mehreren Proben der Hb-Lösung durchgeführt und der Prozeß nach verschiedenen Zeiten gestoppt, so daß man einen Überblick gewinnt, in welcher Geschwindigkeit die Reaktion abläuft. Der gewünschte p_H -Bereich wurde durch Phosphatpuffer mit einer Endkonzentration von $1,8 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter eingestellt. Konzentration der Reaktionslösung an $KClO_3$: $5,45 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Konzentration an Blutfarbstoff: $5,78 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter; Temperatur 30°C .

2. Die Prüfung der *Oxydationswirkung* des Chlorats auf fetale und reifes Oxy-Hb wurde an den gleichen Hb-Lösungen durchgeführt wie beschrieben. Die Oxydation ließ sich spektrophotometrisch durch den Extinktionsanstieg bei $635\text{ m}\mu$ mit dem Beckman-Gerät erfassen. Die einige Zeit nach der Hämglobinbildung einsetzende Farbstoffdenaturierung stört die Messung bis zur völligen Umwandlung des Oxy-Hämoglobins in Hämglobin nicht, wovon wir uns durch Kontrollen überzeugten, bei denen das Oxy-Hb mittels Kaliumferricyanid oxydiert wurde. Der gewünschte p_H -Bereich wurde durch Phosphatpuffer mit einer Endkonzentration von $1,9 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter eingestellt. Konzentration an $KClO_3$: $1,17 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Konzentration an Blutfarbstoff: $8,4 \cdot 10^{-6}$ Mol/Liter; Temperatur 18 – 19°C .

Wie Abb. 1 zeigt, treten deutliche Unterschiede in der Denaturierungsgeschwindigkeit zutage. *Das Erwachsenen-Oxy-Hb wird merklich rascher denaturiert als das fetale Hb.* So tritt die 50%ige Denaturierung des Erwachsenen-Hämoglobins nach 93 min ein, während das fetale Hb

erst nach 100 min zur Hälfte denaturiert ist. Um ausschließen zu können, daß dieser Unterschied ein zufälliges Ergebnis der Untersuchung bei p_H 6,0 war, prüften wir in weiteren Ansätzen den Denaturierungsablauf bei p_H 5,5 und 6,5. Die Differenz im Sinne einer erhöhten Empfindlichkeit des Erwachsenen-Hämoglobins bleibt jedoch in allen Ansätzen nachweisbar. Bei beiden Blutfarbstoffen beschleunigt sich mit fallendem p_H der Zersetzungs Vorgang, während er bei steigendem p_H langsamer abläuft.

Anders verhält sich die Oxydation der beiden Hämoglobine. Aus Abb. 2 geht hervor, daß Kaliumchlorat fetales Oxy-Hb erheblich rascher

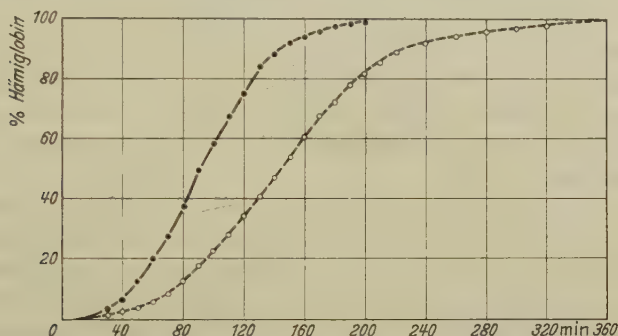


Abb. 2. Oxydation von Oxyhämoglobin durch Kaliumchlorat im Ablauf der Zeit bei p_H 6,0. — = Nabelschnur-Hb, ---- = Erwachsenen-Hb. Blutfarbstoff = $8,4 \cdot 10^{-6}$ Mol/Liter; $KClO_3$ = $1,17 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Phosphatpuffer $1,9 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter; Temperatur $18-19^\circ C$.

oxydiert als reifes Oxy-Hb. Für 50%ige Umwandlung in Hämoglobin verhalten sich die Oxydationsgeschwindigkeiten von fetalem und reifem Hb wie 1:1,59. Bei p_H 5,4 läuft der Prozeß mit größerer, bei p_H 6,5 mit geringerer Geschwindigkeit ab als bei p_H 6,0. Trotzdem bleiben die charakteristischen Unterschiede zwischen den beiden Blutfarbstoffen annähernd in gleicher Weise bestehen.

Nach den vorstehenden Versuchen besitzt das fetale Oxy-Hämoglobin dem Kaliumchlorat gegenüber im Vergleich mit dem Erwachsenen-Oxy-Hb eine deutlich erhöhte Resistenz. Damit besteht — entgegen unserer Vermutung⁹ — wenig Wahrscheinlichkeit, daß die Anwesenheit des fetalen Hämoglobins in der Zelle die *Heinzkörper-Bildung im Neugeborenenerythrocyten* durch Kaliumchlorat befördert. Falls nicht die spezielle Lagerung des fetalen Blutfarbstoffes im Erythrocyten seine Eigenschaften grundsätzlich verändert — wofür wenig Anhaltspunkte bestehen —, dann muß die Mitwirkung anderer Faktoren bei der Heinzkörper-Bildung angenommen werden. Einschränkend ist allerdings zu

sagen, daß die von uns mittels der Salzfällung erfaßten Molekülveränderungen am Hb nicht notwendig mit denjenigen parallel zu gehen brauchen, die zur Heinzkörper-Bildung führen.

Dieses Verhalten überrascht auch deshalb, weil angenommen wurde, daß das Tempo der Hämoglobinbildung den Ablauf der Chloratreaktion mit dem Blutfarbstoff maßgeblich beeinflusst. Der erhöhten Oxydationsneigung entsprechend müßte also unter sonst gleichen Bedingungen in den Ansätzen mit fetalem Hb die Zersetzung rascher erfolgen als in den Ansätzen, die reifes Hämoglobin enthalten. Dies ist aber nicht der Fall. Offensichtlich spielt die Menge des Hämoglobins für die Schnelligkeit des Reaktionsablaufes keine entscheidende Rolle. Selbst die *völlige* Umwandlung des Oxy-Hämoglobins in Hämoglobin vor der Chlorateinwirkung forciert die Denaturierung nicht sonderlich. Hiervon überzeugten wir uns dadurch, daß die Hämiglobine unter den gleichen Versuchsbedingungen wie Oxy-Hämoglobine zersetzten. Nimmt man die Halbwertszeiten als Maßstab, dann verhalten sich die Zeiten für Hämoglobin: Oxy-Hb beim fetalen Blutfarbstoff wie 1:1,05, beim Erwachsenenblutfarbstoff wie 1:1,09.

Der formale Ablauf der Reaktionen vollzieht sich für fetales und reifes Hb in sehr ähnlicher Weise. Die *Oxydation* der Blutfarbstoffe beginnt nach einer gewissen Latenzzeit, führt zu rascher Geschwindigkeitszunahme, um endlich wieder langsam zu werden. Eine solche S-Kurve wurde auch bei der Oxydation von Oxy-Hb durch Nitrit gefunden¹. Sie entspricht einem autokatalytischen Vorgang⁷. Ein andersartiges Verhalten finden wir bei der *Denaturierung*, wo ein recht komplizierter Kurvenzug resultiert. Offensichtlich bestehen 2 schnelle Reaktionsphasen, wovon unter unseren Versuchsbedingungen die eine gleich, die andere etwa 60 min nach Giftzugabe zu den Hb-Lösungen einsetzt und 2 langsamere Phasen; die erste liegt zwischen der 20. und 60. min, die zweite nach der 120. min gegen Ende der Reaktion. Wir vermuten, daß diese Art des Reaktionsablaufes durch eine Überlagerung von *zwei* Zersetzungsprozessen zustande kommt, die das Oxy-Hb und das Hämoglobin betreffen, welche zumindest während der ersten Zeit der Chlorateinwirkung nebeneinander im Ansatz sind. Anscheinend bestehen Abweichungen hinsichtlich der Denaturierung der beiden Blutfarbstoffarten. Wie allerdings die Vorgänge im einzelnen ineinandergreifen und wie das Hämoglobin als Katalysator diese Reaktionen beeinflusst, bedarf der weiteren Klärung.

Zusammenfassung.

Im vorstehenden werden die Geschwindigkeiten der Denaturierung und der Oxydation von fetalem und reifem Oxy-Hb nach Kaliumchlorateinwirkung untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Zersetzung des

reifen Hämoglobins rascher vor sich geht als diejenige des fetalen Hämoglobins. Im Gegensatz dazu läuft die Oxydation des reifen, verglichen mit dem fetalen Hämoglobin langsamer ab.

Literatur.

- ¹ BETKE, K.: Naturwissenschaften **40**, 60 (1953). — ² BETKE, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff. Springer-Verlag 1954. — ³ HEUBNER, W.: Klin. Wschr. **1941**, 137. — ⁴ HEUBNER, W., u. F. JUNG: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 27. — ⁵ JUNG, F.: Naturwissenschaften **1942**, 31. — ⁶ JUNG, F.: Klin. Wschr. **1947**, 459. — ⁷ JUNG, F., u. H. REMMER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 459 (1949). — ⁸ KÜNZER, W.: Z. Kinderheilk. **73**, 265 (1953). — Klin. Wschr. **1953**, 585. — ⁹ KÜNZER, W., E. AMBS u. D. SCHNEIDER: Z. Kinderheilk. **74**, 652 (1954).

Doz. Dr. WILHELM KÜNZER, Würzburg, Univ.-Kinderklinik.

Dr. DOROTHEA SAFFER, Innsbruck, Med.-chem. Institut.

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. G. EWALD).
Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. LENDLE).

Hirnelektrische Untersuchungen über die Wirkung von Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (E 605) an Kaninchen und über einen begrenzten Antagonismus zwischen E 605 und Atropin an Katzen.

Von
F. DUENSING und W.-D. ERDMANN.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juni 1954.)

Nach den ersten Mitteilungen (HOFFMANN; DUBOIS, DOULL, SALERNO und COON; HECHT und WIRTH) über Pharmakologie und Toxikologie des Schädlingsbekämpfungsmittels E 605 („Parathion“, Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat) haben sich zahlreiche Untersucher um eine Analyse der Wirkungsweise dieser Substanz bemüht. Da E 605 zur Gruppe der Cholinesterase-Hemmstoffe (Anti-Cholinesterasen, Anti-Ch. E.) gehört, entsprechen die Vergiftungs-Symptome weitgehend denen einer „endogenen Acetylcholin (A.Ch.)-Vergiftung“ (HAMBLIN und MARCHAND).

Der Verlauf der E 605-Vergiftung ist charakterisiert durch starke Erregungserscheinungen im Gebiet der parasymphatisch innervierten Erfolgsorgane (Miosis, Bradykardie, Bronchospasmus, Darmspasmus, Tränen- und Speichelfluß und andere) sowie durch zentralnervös bedingte motorische Erregungen (Tremor, Myokloni, Koordinationsstörungen, Krampf) oder auch Lähmungen (diese können bei manchen Tierarten oder Individuen das klinische Bild sogar beherrschen!). Der Tod erfolgt an Atemlähmung. *Das Vergiftungsbild setzt sich also aus muscarinartigen und nicotinartigen Wirkungen zusammen* (LEHMANN).

A.Ch. besitzt neben seinen muscarinartigen Wirkungen einen nicotinartigen Angriffspunkt (Erregung von cholinergischen Synapsen), So ist es verständlich, daß diese Parallelität den Gedanken nahelegt, die zentralnervösen Wirkungen von E 605 (ebenso wie seine peripheren, muscarinartigen Wirkungen) als Folgen einer Anti-Ch.E.-Wirkung von E 605 zu betrachten.

Eine Hemmung der Hirn-Ch.E. um durchweg 80% (DUBOIS u. Mitarb.; FRAWLEY, HAGAN u. FITZHUGH) und ein starker Anstieg des freien A.Ch. im ZNS sind in

der Tat nachgewiesen. Die gefundenen Werte gehen jedoch den Vergiftungssymptomen nicht immer parallel (FRAWLEY u. Mitarb.). Auch ist die Frage, ob A.Ch. im ZNS als Überträgerstoff überhaupt eine Rolle spielt, noch nicht eindeutig beantwortet (vgl. HERKEN u. NEUBERT).

Die breite Verwendung von E 605 als Schädlingsbekämpfungsmittel spiegelt sich natürlich auch in einer zunehmenden Zahl von E 605-Vergiftungsfällen wieder (vgl. HAGEN u. REINL; HECHT; VOGEL; LEONHARDT und viele andere). Für die Therapie kommen selbstverständlich in erster Linie Parasympathicolytika als Antidot in Betracht. Durch Atropin werden die oft lebensbedrohlichen muscarinatigen Symptome (Bronchospasmus, Kollaps) in der Tat schnell beseitigt. Ein Einfluß von Atropin auf die zentralen E 605-Wirkungen ist jedoch nicht mit Sicherheit erwiesen.

Natürlich ist eine fortlaufende elektroencephalographische Kontrolle des Vergiftungsverlaufes besonders geeignet, die zentralnervösen Wirkungen von E 605 und etwaigen Antidoten zu studieren.

ENDERS u. RUF haben die Wirkung von E 605 auf das Elektroencephalogramm von Katzen beschrieben und dabei verschiedene Stadien unterschieden:

In der ersten Phase kommt es in sämtlichen Ableitungen zu hochfrequenter, kleinamplitudiger Aktion (β -Wellen). Die zweite Phase ist durch generalisierte Krampfstromabläufe gekennzeichnet. In der dritten Phase sind die Großhirnregionen elektrisch ruhig, während sich in den tiefen Hirnregionen und im Kleinhirn immer noch Krampfstromabläufe finden. Klinisch gehen dem 2. Stadium Muskelzuckungen und Konvulsionen, dem 3. Stadium heftiges Muskelfibrillieren parallel. Um einen Einfluß der Kreislaufwirkungen von E 605 auf das EEG zu vermeiden, gehörten Atropin-Vorbehandlung (1 mg/kg i.v.) und Sauerstoff-Insufflation zu den Versuchsbedingungen.

Die Autoren stellten ferner fest, daß die motorischen Erregungserscheinungen nach E 605 am intakten Tier zwar von allen Hirnteilen ausgelöst werden, daß für ihr Zustandekommen jedoch die tieferen Hirnregionen einschließlich Kleinhirn ausreichen. Ein hemmender Einfluß von Atropin (in sinnvoller Dosierung) auf die motorischen Entladungen wird bestritten.

Für eine weitere Analyse der E 605-Wirkungen auf das Zentralnervensystem hatten wir uns zwei Aufgaben gestellt:

I. Eine Klärung der Frage, warum manche Tiere bzw. Tierarten bei der Vergiftung mit E 605 *keine* motorische Erregungserscheinungen zeigen.

Für die meisten Tiere wird ein Nebeneinander von motorischen Reiz- und Lähmungserscheinungen bei der Vergiftung mit E 605 beschrieben (vgl. auch ENDERS und RUF). Bei Kaninchen (außerdem bei allen Kaltblütern!) stehen Lähmungen sogar im Vordergrund des Vergiftungsbildes (HAGEN und REINL). Eine elektroencephalographische Kontrolle des Vergiftungsverlaufes am Kaninchen erschien geeignet zu klären, ob hier eine besondere Wirkungsweise von E 605 vorliegt.

II. Eine Klärung der Frage, ob Atropin die zentralnervösen E 605-Wirkungen zu beeinflussen vermag oder nicht.

Die bisherigen Untersuchungen über einen zentralen Antagonismus von E 605 und Atropin sind so widerspruchsvoll (WILHELMI u. DOMENJOZ; DUBOIS, DOULL, SALERNO u. COON; SALERNO u. COON; JAETH; CHENNELLS, FLOYD u. WRIGHT; HECHT u. WIRTH; ENDERS u. RUF u. a. m.), daß eine Prüfung der Wirkung von Atropin auf die elektroencephalographischen Veränderungen nach E 605 an der Katze notwendig schien.

In den Versuchen von ENDERS u. RUF wäre eine antagonistische Wirkung von Atropin nur dann zu erwarten gewesen, wenn es sich um einen parallel steigenden Antagonismus zwischen E 605 und Atropin handeln würde, da ja Atropin bereits zu Versuchsbeginn gegeben worden war!

Ein zentraler Antagonismus von E 605 und Atropin wäre pharmakologisch schon deswegen interessant, weil es sich ja bei beiden Stoffen um ausgesprochene Krampfgifte handelt. Eine besondere Bedeutung käme einem solchen Antagonismus vielleicht auch im Hinblick auf die Frage zu, ob die zentralen E 605-Wirkungen als Folgen einer A.Ch.-Anhäufung im ZNS angesehen werden dürfen oder nicht.

I. Versuche an Kaninchen.

Methodik.

Die Versuche wurden an 18 Tieren durchgeführt. Das Elektroencephalogramm wurde nur von der Hirnrinde, und zwar von der Präzentris und Striata beiderseits, teils mit in den Knochen eingeschraubten Elektroden, teils nach stattgehabter Trepanation mit Wollfadenelektroden abgeleitet. Bei einem Teil der Tiere wurden fernerhin Muskelpotentiale, EKG, Blutdruck und Atmung registriert. Die operativen Eingriffe wurden in Lokalanästhesie (Novocain) durchgeführt.

Der als 10%ige Lösung in absolutem Alkohol vorliegende Wirkstoff E 605 wurde zur i.v. Injektion mit Adhaegon¹-RINGER-Lösung auf 10^{-3} weiterverdünnt. Die für die lokale Verwendung hergestellten Konzentrationen von E 605 werden unter den Befunden mitgeteilt.

Besprechung der Ergebnisse.

Abb. 1 a zeigt das normale EEG des entspannten Tieres. Nach intravenöser Injektion von E 605 (2 mg/kg) kommt es zu charakteristischen Veränderungen im Hirnstrombild, die sich in zwei Stadien einteilen lassen:

Die erste Phase äußert sich in einem stets regelmäßigen Rhythmus kleiner Wellen von 4—6/sec (Abb. 1 b). Klinisch beobachtet man gleichzeitig die bekannten Symptome der Parasympathicusreizung einschließlich Bronchialspasmus und Entleerung von Blase und Darm. Gibt man in diesem Stadium Atropin in hohen Dosen (1—2 mg/kg intravenös), so kehrt das normale Ruhe-EEG des Tieres zurück.

Das 2. EEG-Stadium schließt sich unmittelbar an das 1. Stadium an und ist durch ein Auftreten von langsameren Deltawellen, als sie der normalen Aktion eigen sind, gekennzeichnet. Schließlich erlischt die

¹ = indifferentes Eiweißabbauprodukt (HEYDEN), als Stabilisator für feindisperse Suspensionen geeignet.

Aktion nach einem kurzen black-out-Stadium ganz. Klinisch läuft dieser Wandlung des hirnelektrischen Bildes eine fortschreitende Abflachung der Atmung und ein Absinken des Blutdruckes parallel. Atemstillstand und kurze terminale Konvulsionen bilden den Schlußakt und fallen zeitlich mit dem Erlöschen der Hirnpotentiale zusammen. Durch rechtzeitige künstliche Atmung (im Deltawellen-Stadium oder bald nach dem Flachwerden der Aktion) kann meist ein mehr oder weniger normales

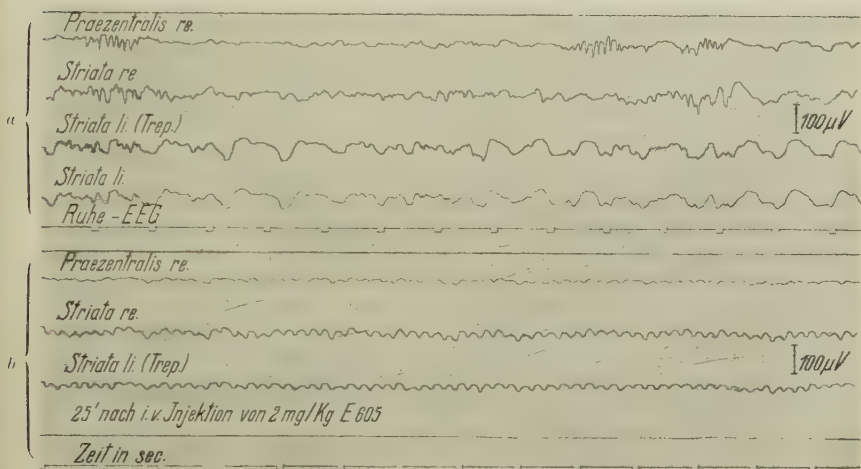


Abb. 1. Kaninchen 1, 2,5 kg. *a* Normales EEG des entspannten Tieres. *b* EEG des gleichen Tieres 25 min nach i.v. Injektion von E 605 (2 mg/kg). In allen Ableitungen des Cortex Frequenzen von 4—6/sec. Das Tier zeigt alle Symptome einer parasympathischen Erregung.

EEG wiederhergestellt werden. Krampfphänomene haben wir niemals im EEG gefunden.

Das in der ersten EEG-Phase zu beobachtende Hirnstrombild von Wellen mittlerer Amplitude und fixierter Frequenz von 4—6 sec wird in der angelsächsischen Literatur auch als „desynchronisation“ bezeichnet.

Eine Desynchronisation wurde u. a. nach Gabe von Anti-Ch.E.-Stoffen wie Eserin (BRADLEY u. ELKES; eigene unveröffentlichte Befunde) oder DFP (HIMWICH; BRADLEY, CERQUIGLINI u. ELKES), aber auch nach Gabe von Muskelrelaxantien wie d-Tubocurarin, Flaxedil, Dekamethonium und Succinylcholin (BOVET u. LONGO) gefunden. Als Ursachen für die Auslösung einer Desynchronisation haben BOVET u. LONGO Blutdrucksenkung, Temperaturabfall und Anoxie ausgeschlossen. Eine Reihe von Befunden (vgl. BOVET u. LONGO) sprach dagegen dafür, daß es sich bei der Desynchronisation um eine Reaktion auf viscerale, proprioceptive Impulse handelt.

Da E 605 ein sehr starkes vegetatives Nervengift ist, liegt die Annahme nahe, daß auch in diesem Falle *periphere*, viscerale Reaktionen zu dem Bilde der „Desynchronisation“ als einer besonderen Form von „blocking reaction“ führten, zumal Atropin gut antagonistisch wirksam war.

Eine andere Deutung wäre auch mit Hilfe einer Theorie von KORNMÜLLER möglich, wonach als Substrat der trägen Wellen im EEG die Hüllzellen der Ganglienzellen zu betrachten sind. KORNMÜLLER schreibt diesen Neurogliazellen eine vegetativ-cerebrale Funktion zu. Ein Angriff von E 605 wäre hier funktionell verständlich. Es liegen jedoch noch keine Angaben darüber vor, welche biochemischen Vorgänge den Hüllzellen zugeordnet werden können, so daß eine Berücksichtigung von hier eingreifenden E 605-Wirkungen nicht möglich ist.

Die EEG-Veränderungen der zweiten Phase sind unseres Erachtens als Ausdruck einer Sauerstoffmangel-Schädigung des Gehirns infolge Blutdrucksenkung und Asphyxie zu werten. Dafür spricht besonders die Tatsache, daß durch künstliche Beatmung das EEG wiederhergestellt wird, oder — nach länger dauernder Anoxieschädigung des Gehirns — die Spontanrhythmen in Form von Deltawellen wieder angefaßt werden können. Die erwähnten terminalen Konvulsionen verlaufen ohne jede Krampferscheinung im hirnelektrischen Bild. Sie dürften durch Irritation des Hirnstammes und Rückenmarks zustandekommen, Teile des ZNS, die gegenüber Sauerstoffmangel bekanntlich widerstandsfähiger sind als die phylogenetisch junge Rinde.

Übrigens haben AJMONE, MARSAN u. FUORTES zeigen können, daß auch die Konvulsionen, die im Gefolge des durch i.v. Gabe von A.Ch. bedingten Herzstillstandes auftreten, von einem Flachwerden der corticalen Potentiale bei gleichzeitiger Hyperaktivität des Rückenmarks infolge Anoxie begleitet sind.

Während bei der Katze die nach E 605-Vergiftung auftretenden Krampferscheinungen mit Krampfpotentialen in allen Hirnteilen einhergehen (ENDERS und RUF; eigene Befunde siehe unten), wirkt E 605 bei intravenöser Gabe an Kaninchen *nicht* als Hirnkrampfstoff, sondern verursacht allenfalls motorische Unruhe und kurze terminale Konvulsionen. Eine Deutung dieses völlig andersartigen Verlaufes legen die bekannten Untersuchungen von RUF über die Bedeutung der Sauerstoffzufuhr und der Hirndurchblutung auf die Unterhaltung des Rindenkrampfes nahe. Danach müßte E 605 auch beim Kaninchen Krämpfe verursachen können, wenn man diesen Stoff so appliziert, daß Kreislauf- und Atemzentren nicht geschädigt werden, nämlich unmittelbar cortical.

Die Applikation von E 605 (in Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-1}) auf die Rinde der Area striata führt bei weiblichen Kaninchen¹ zu typischen Krampfbildern. Abb. 2a zeigt einen auf die linke (mit E 605 behandelte) Striata beschränkten Krampfstromanfall mit einer kontinuierlichen Folge von Spikes. Meist kommt es sehr rasch zur Irradiation auf andere Hirnregionen. In Abb. 2b greift der Krampf von der linken

¹ Bei männlichen Kaninchen kommt es lediglich zu lokalen Veränderungen im Sinne regelmäßiger Wellen von 4—6/sec. Eine Ausbreitung dieser 4—6 Hz-Rhythmen auf andere Hirnregionen kommt vor. Auf geschlechtsabhängige Unterschiede der E 605-Wirkung wurde auch von WILHELMI u. DOMENJOZ, von DUBOIS, DOULL, SALERNO u. COON, von ENDERS, KÖRTING u. WEILAND sowie von FRAWLEY, HAGAN u. FITZHUGH hingewiesen.

auf die rechte Striata über, in Abb. 2 c von der linken Striata auf die linke Präzentralis, wobei die Aktion der rechten Seite bis auf einzelne Spikes im Bereich der rechten Striata ungeändert bleibt. Meist kommt es schließlich zur Generalisierung. Der klinische Krampf setzt durchweg dann ein, wenn die Präzentralis in das corticale Krampfgeschehen einbezogen

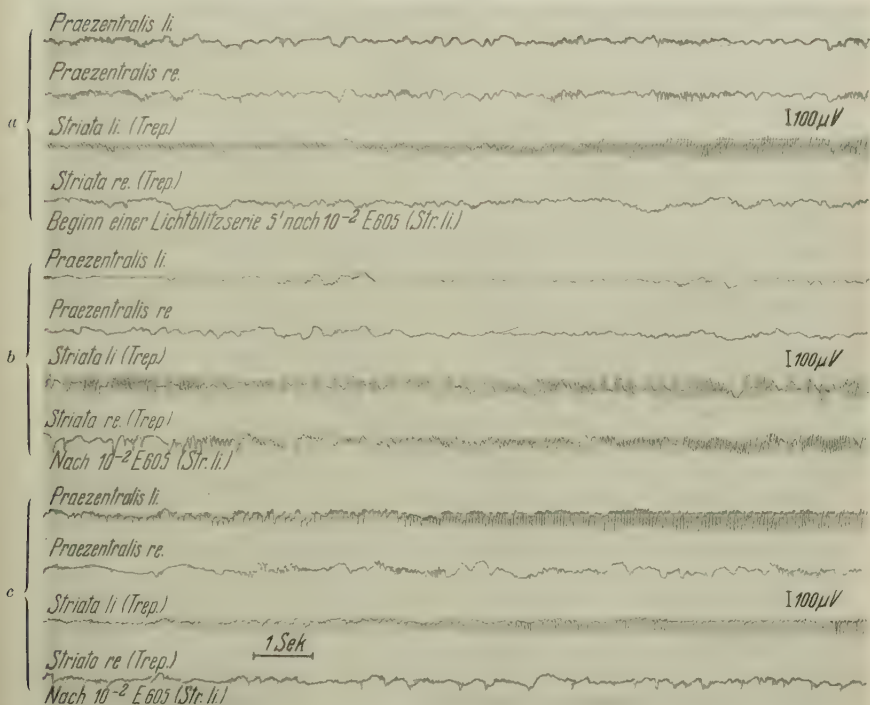


Abb. 2. Kaninchen 14, 2,5 kg. a 5 min nach Applikation von E 605 (10^{-2}) in die Trepanationslücke über der linken Striata kommt es zu lokalen Krampfpotentialen in Form von kontinuierlichen Spikes (10/sec). Der Krampfanfall war durch rhythmische Belichtung des re. Auges ausgelöst worden. b 30 min nach corticaler Applikation von E 605. Der Krampfstromanfall greift von der li. auf die re. Striata über. c 35 min nach corticaler Applikation von E 605. Irradiation des Krampfstromanfalls von der li. Striata auf die gleichseitige Präzentralis.

wird. Im übrigen beobachtet man nicht nur kontinuierliche Spikes, sondern auch andere Krampfformationen (Spitze-Woge-Formen bis zum grand-mal-Typ). Diese über viele Stunden anhaltenden klinischen und hirnelektrischen Krampferscheinungen lassen sich durch Äther (lokal und Inhal.) und Novocain ($1\frac{1}{2}\%$ lokal) befristet löschen. Auch die intravenöse Injektion von E 605 (2 mg/kg i. v.) führt zu einem Sistieren des Krampfgeschehens, was offenbar mit der Blutdrucksenkung bzw. der eintretenden Anoxie zusammenhängt. Ein Einfluß von Atropin (1—5 mg/kg i. v.) ist in diesem Stadium der lokalen E 605-Vergiftungen nicht zu beobachten.

Die Umrechnung der bei der Katze zum Krampf führenden Dosis von E 605 (ENDERS u. RUF: ab 50 mg/kg i.v.) in die vermutliche E 605-Konzentration im Blute ergibt, daß ein durch lokale Applikation von E 605 ausgelöster Rindenkrampf beim Kaninchen schon mit einer Konzentration von 1:2000 erreicht werden müßte. Als Lösungsmittel der 1%igen E 605-Lösung war in unseren Versuchen eine 10%ige Lösung von absolutem Alkohol in Adhagon-RINGER-Lösung verwendet worden. Diese alkoholische Lösung hatte ebenso wie Alkohol abs. in Kontrollversuchen keine Krampfwirkung auf das EEG, sie war dagegen in der Lage, den durch E 605 gesetzten lokalen Krampf zu löschen. Es leuchtet ein, daß die dem E 605 antagonistische Wirkung des Lösungsmittels zu einer Erhöhung der Krampfschwellen-Konzentration von E 605 führen muß.

Unsere Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von E 605 beim Kaninchen sprechen dafür, daß die medullären Zentren dieser Tiere besonders empfindlich gegen E 605 sind: Die primär einsetzende Einschränkung der Atmung und die Blutdrucksenkung entsprechen nicht den für die Auslösung von Rindenkrämpfen notwendigen Bedingungen (vgl. RUF). Da die E 605-Vergiftung auch bei anderen Individuen (Mensch!) oder Tierarten *ohne* Krampferscheinungen zum Tode führen kann, bedarf die Empfindlichkeit des Atemzentrums gegen E 605 bei den therapeutischen Maßnahmen einer besonderen Berücksichtigung.

II. Versuche an Katzen.

Methodik.

Das Elektroencephalogramm wurde an 16 Tieren sowohl von der Hirnrinde (Präzentralis, Striata und Kleinhirn) als auch von tieferen Hirnregionen (lat. und med. Thalamus, Mittelhirn, Kleinhirnerne) mit bipolaren Nadelelektroden nach der HESSschen Methodik, gelegentlich auch mit epiduralen, in den Knochen eingeschraubten Elektroden, abgeleitet. Die Elektrodenlage wurde durch Serien-schnitte kontrolliert. Bei einem Teil der Tiere wurden außerdem Muskelpotentiale, EKG, Blutdruck und Atmung registriert. Spätestens bei Auftreten bedrohlicher Vergiftungssymptome wurde künstliche Atmung (zum Teil mit O₂) eingeleitet. Die operativen Eingriffe wurden in Lokalanästhesie (Novocain) durchgeführt.

E 605 wurde in 10%iger alkoholischer Lösung (i.v.), in 10%iger ölgiger (Olivenöl) Lösung (i.p. oder i.m.) und in Reinsubstanz (i.p. oder i.m.) zur Injektion verwendet.

Ergebnisse.

Als ein typisches Beispiel für die Wirkung von E 605 auf das EEG und die (begrenzte) antagonistische Wirkung von Atropin diene der Protokollauszug eines Versuches vom 7. 11. 1952. Hierzu zeigen Abb. 3a bis e ausschnittsweise die wesentlichen Stadien des fortlaufend registrierten Vergiftungsverlaufes.

Katze 13, 2,5 kg, weiblich.

Elektrodenlage. Ableitung 1: Präzentralis re. bipolar; Ableitung 2: Striata li./Striata re. bipolar; Ableitung 3: Kleinhirn-Tiefe re. (N. emboliformis) bipolar; Ableitung 4: Kleinhirn-Tiefe li. (Uvula) bipolar.

15.05 Uhr Beginn der Registrierung bei fortlaufender künstlicher Beatmung mit Sauerstoff (4 l/min).

15.50 Uhr Normales EEG des entspannten Tieres (Abb. 3a).

15.56 Uhr Injektion: 100 mg/kg E 605 intraperitoneal.

16.20 Uhr Fibrilläre Zuckungen, Speicheln, Defäkation. EEG: in sämtlichen Ableitungen hochfrequenter, kleinamplitudiger Grundrhythmus mit Ausnahme von

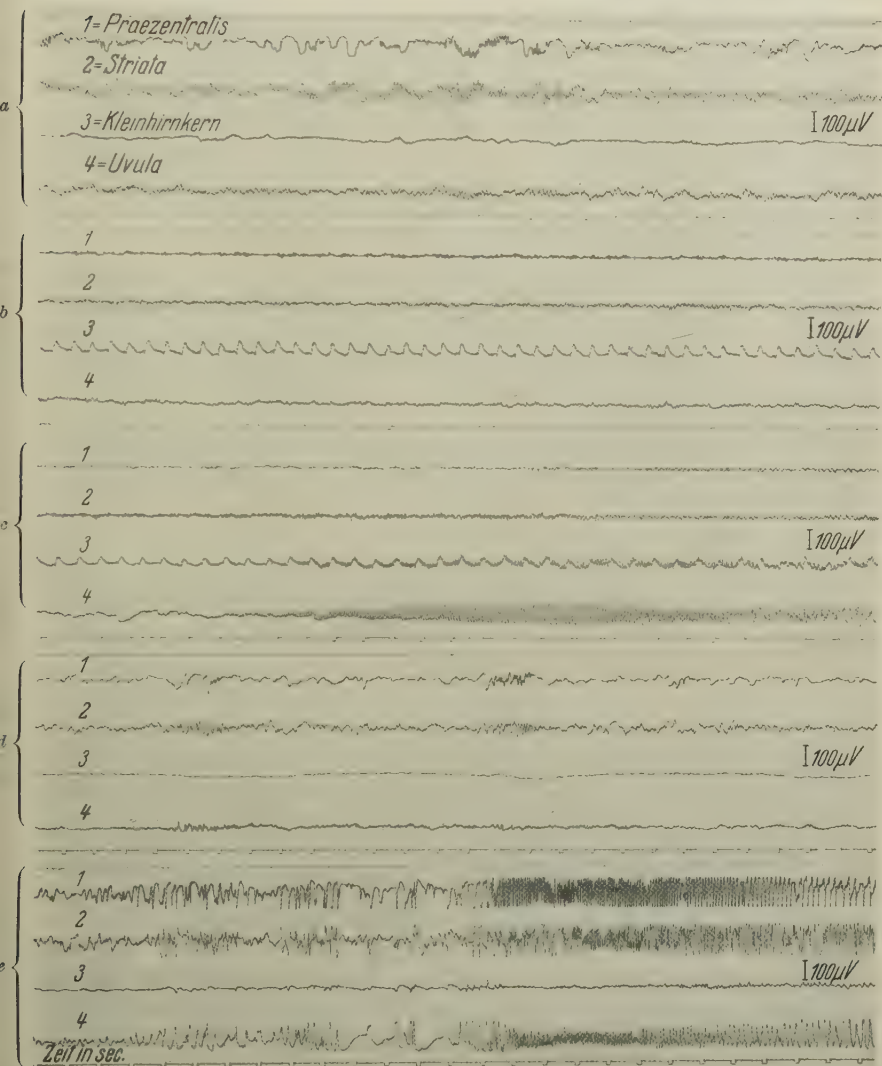


Abb. 3. Katze 13, 2,5 kg. *a* Normales EEG des entspannten Tieres. *b* 32 min nach i.p. Injektion von E 605 (100 mg/kg). Krampfdelta wellen in V. III (N. emboliformis). Myokloni der Hinterbeine. *c* 36 min nach Injektion von E 605. Beginn eines Krampfstromanfalles in V. IV (Uvula). *d* 24 min nach i.v. Injektion von Atropin (4 mg/kg). Normalisierung des Vergiftungsbildes. Klinisch unauffällig. *e* 23 min nach erneuter Injektion von E 605 (2×20 mg/kg i.v.). Generalisierte Krämpfe, die durch Atropin nicht mehr beeinflusst werden können (vgl. im Text!).

Abl. 1, wo regelmäßige, schwachgipfelige Schwankungen von 1—2/sec mit überlagerten Frequenzen von 12/sec imponieren. In Abl. 3 sind spontan kontinuierliche Krampfdeltawellen von 2/sec erschienen (ebenfalls hochfrequente Überlagerung).

16.26 Uhr Tremor und Myokloni der Hinterbeine.

16.28 Uhr EEG: vgl. Abb. 3b.

16.32 Uhr EEG: In Abl. 1 sehr kleine Amplituden der beschriebenen Wellen.

In Abl. 2 einzelne Mikrospikes. In Abl. 3 sind die Krampfdeltawellen in Amplitude ($150\mu\text{V} \rightarrow 50\mu\text{V}$) und Frequenz (2/sec $\rightarrow$ 1,5/sec) zurückgegangen. In Abl. 4 Beginn eines Krampfes (Abb. 3c). Dieses Bild wiederholt sich mehrmals, wobei auch klinische Krampfanfälle beobachtet werden. Die corticalen Ableitungen zeigen dabei keinerlei Krampfphänomene!

16.41 Uhr Injektion: 4 mg/kg Atropin i.v. Schlagartige Normalisierung des EEG. Klinisch treten jetzt keine Myokloni oder Konvulsionen mehr auf.

17.05 Uhr EEG: Vgl. Abb. 3d.

17.28 Uhr Injektion: 20 mg/kg E 605 i.v.

17.40 Uhr Injektion 20 mg/kg E 605 i.v. EEG: Nach einem Stadium von Gruppen mit Wellen von 5/sec und latenten Krampfstrompotentialen kommt es schließlich zu generalisierten Krampfstromabläufen, die in Abl. 2 und Abl. 4 am stärksten und längsten ausgeprägt sind. In Abständen von etwa 4 min erfolgen immer wieder Krampfanfälle. Diese haben mitunter kein klinisches Äquivalent.

17.51 Uhr EEG: Vgl. Abb. 3e.

17.54 Uhr bis 18.39 Uhr Immer stärkere Ausprägung der Krämpfe, die durch i.v. Injektionen von Parpanit (2 mg/kg) und Atropin (insgesamt 12 mg/kg) nicht mehr zu beeinflussen sind.

18.40 Uhr Tötung des Tieres in Äthernarkose.

Als wesentliches Ergebnis unserer Versuche sind folgende Befunde zu nennen (vgl. hierzu auch Abb. 3 und den wiedergegebenen Protokollauszug):

1. Das extrapyramidale Stadium (Tremor, Myokloni) der E 605-Vergiftung besitzt ein encephalographisch sichtbares Substrat in bestimmten Teilen des Paläencephalon (Stammhirnkerne, Mittelhirn, Brücke, Kleinhirnkerne) in Form von Krampfdeltawellen, Spitze-Woge-Formationen oder kontinuierlichen Spikes. Letzteren geht gelegentlich ein klinischer Krampfanfall parallel. Die corticalen Hirnregionen zeigen zur gleichen Zeit eine hochfrequente und kleinamplitudige Aktion (β -Wellen)¹. Bei manchen Tieren läßt sich noch vor Beginn des β -Wellen-Stadiums ein deutlich ausgeprägtes Stadium von 8—10 Hz-Wellen in sämtlichen corticalen Ableitungen erkennen.

2. Das Krampfstadium der E 605-Vergiftung wird von elektroencephalographischen Krampfstromabläufen in allen Ableitungen begleitet. Krampfstrombilder ohne klinisches Äquivalent kommen vor.

3. *Hohe Dosen von Atropin (1—4 mg/kg i.v.) normalisieren nur das unter 1., nicht aber das unter 2. beschriebene Stadium der E 605-Vergiftung.*

¹ Dies erklärt auch die gelegentliche Beobachtung von klinischen Krampfanfällen ohne entsprechende EEG-Phänomene: Die Elektroden lagen hierbei also offenbar in Hirnregionen, die vom Krampfvorgang nicht berührt wurden!

Da die elektroencephalographischen Untersuchungen von ENDERS u. RUF unter Atropinschutz durchgeführt wurden, war eine volle Übereinstimmung der Befunde nicht zu erwarten. Die von diesen Autoren mitgeteilten Befunde (siehe S. 2) werden durch unsere Versuche um die unter Punkt 1 und Punkt 3 genannten Ergebnisse erweitert.

Bei der *Besprechung der Ergebnisse* verdienen unseres Erachtens 3 Gesichtspunkte ein besonderes Interesse.

- a) Die Frage der Dosierung von E 605,
- b) der primäre Angriff von E 605 in den Stammhirngebieten und der Antagonismus von Atropin,
- c) die „lähmende“ Komponente der E 605-Wirkung.

Zu a): Die letale Dosis von E 605 an Katzen liegt zwischen 15 und 20 mg/kg (HECHT und WIRTH; eigene Befunde). Die bei den elektroencephalographischen Untersuchungen zur Vergiftung verwendeten Dosen von E 605 lagen jedoch meist erheblich höher (50—100 mg/kg i. m.). Auch ENDERS und RUF haben derartig hohe Dosen benötigt.

Natürlich hat die künstliche Beatmung oder O₂-Insufflation die letale E 605-Dosis in den Bereich wesentlich höherer Dosen verschoben (vgl. auch S. 510). Überdies traten Krampferscheinungen erst bei dieser hohen Dosierung auf. Eine die Krampfreaktion abschwächende Wirkung der künstlichen Atmung ist jedoch praktisch nur bei Hyperventilation (wegen der damit verbundenen Minderdurchblutung des Gehirns) zu erwarten. Möglicherweise stehen aber die für die Auslösung von Krampfreaktionen benötigten, ungewöhnlichen hohen E 605-Mengen mit der Verwendung von Novocain in direktem Zusammenhang, das sowohl von ENDERS und RUF (hier allerdings auch Atropinvorbehandlung! Vgl. S. 507) als auch von uns zur Lokalanaesthesie benutzt wurde. Von ATANACKOVIC u. Mitarb. ist eine Schutzwirkung von Novocain gegen DFP und Eserin, zwei dem E 605 sehr verwandte Stoffe, beschrieben worden. Auch aus den auf Seite 511 beschriebenen Versuchen am Kaninchen geht eine den E 605-Krampf hemmende Wirkung von Novocain hervor. Die Annahme einer gegen die Vergiftung mit E 605 schützenden Wirkung von zur Operation benötigten Novocainmengen liegt nahe. In diesem Zusammenhang ist vielleicht auch von Bedeutung, daß die Novocainesterase gegen das Esterasegift E 605 etwa 300mal empfindlicher ist als die Cholinesterase (PULVER u. DOMENJOZ).

Zu b): Die Tatsache einer gewissen therapeutischen Wirkung von Atropin auch gegen die zentralnervösen E 605-Wirkungen läßt sich nach unseren Versuchen nicht übersehen. Dieser Antagonismus zwischen E 605 und Atropin scheint sich allerdings nur im Bereich der phylogenetisch älteren Hirnteile abzuspielen. Klinisch werden gleichzeitig die durch E 605 ausgelösten Myokloni durch Atropin aufgehoben (vgl.

hierzu ERDMANN und SCHAEFER), ein Befund, der an die guten therapeutischen Erfolge mit Atropin gegen extrapyramidale Symptome beim Menschen erinnert.

Der auf die entwicklungsgeschichtlich älteren Hirnregionen beschränkte Antagonismus zwischen dem Cholinesterasegift E 605 und Atropin legt vielleicht den Gedanken nahe, daß in diesem Gebiet Acetylcholin als synaptischer Überträgerstoff fungiert und daß daher Atropin — wie auch an anderen cholinergen Synapsen — die betroffenen Ganglienzellen gegen die durch Ch.E.-Hemmung hervorgerufene Anhäufung von A.Ch. schützen kann.

Auf Grund ihrer Untersuchungen über den Einfluß von Tetraäthylammonium (TEA) auf die synaptische Erregungsübertragung kamen auch GELLHORN, BALLIN,

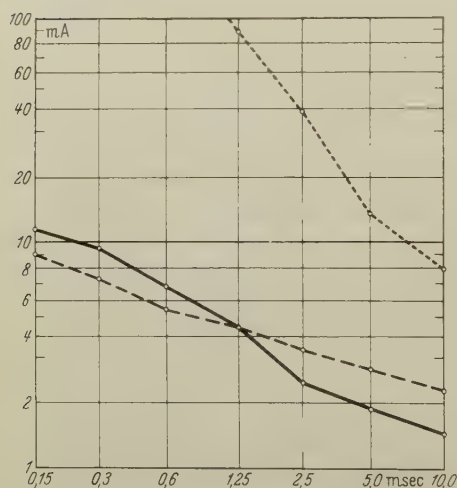


Abb. 4. Katze 13, 2,5 kg. Reizzeit-Stromstärke-Kurve bei Reizung des Cortex motor. — normal; nach 100 mg E 605; - - - - nach 4 mg/kg Atropin. Abszisse: msec in log. Teilung, Ordinate: mA in log. Teilung. Näheres vgl. im Text.

RIGGLE u. REDGATE zu dem Schluß, daß nur die phylogenetisch älteren Teile des somatischen Nervensystems cholinerge Synapsen besitzen. HARD u. PETERSON haben sich um einen histochemischen Nachweis der Cholinesterase im ZNS des Hundes bemüht und die stärkste Reaktion in Kernen des Hirnstammes gefunden, während Großhirn- und Kleinhirnrinde keine deutlich positive Reaktion zeigten. Auf die Problematik der Wirkungsweise von A. Ch. im Zentralnervensystem kann an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden (Lit. bei FELDBERG). Immerhin besteht ein hirnelektrisch nachweisbarer Antagonismus von Atropin auch gegen andere Hemmstoffe der Cholinesterase, wie z. B. gegen DFP (WESCOE, GREEN, McNAMARA u. KROP) oder Eserin (BRADLEY u. ELKES).

Der periphere Angriff von E 605 am Gefäßsystem wie auch

der Angriff am Vasomotorenzentrum führen natürlich zu Irregularitäten im Blutdruck und vermutlich auch in der Blutverteilung. So erscheint eine rein durchblutungsbedingte zentralnervöse Lokalisation des Angriffspunktes von E 605 prinzipiell möglich. (Vgl. dazu jedoch KEMPE, dieses Arch. S. 533.)

Zu c): Im Verlaufe der E 605-Vergiftung kann es zu hirnelektrischen Krampfstromabläufen kommen, die von keinen klinischen Symptomen begleitet sind. Eine Deutung dieses Befundes, den wir sehr oft haben erheben können, wäre mit Hilfe der bekannten zentralnervös lähmenden

Komponente der E 605-Wirkung (vgl. auch ENDERS und RUF) möglich, zumal zu diesem Zeitpunkt nachweislich keine neuromuskuläre Lähmung vorlag.

Um einen Einblick in die Erregbarkeitsverhältnisse der motorischen Hirnrinde zu erhalten, wurden daher an 10 Katzen mit Hilfe von bipolaren elektrischen Reizungen der Präzentralwindung die Schwellenstromstärken für verschiedene Reizeiten bestimmt. Als positiver Reizerfolg galt die eben erkennbare (isolierte) Reaktion am kontralateralen Hinterbein.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, wird die Reizeit-Stromstärke-Kurve unter E 605 zur Seite höherer Stromstärken hin verschoben und durch Atropin normalisiert. Es handelt sich hier um das gleiche Versuchstier (Katze 13) wie bei Abb. 3.

Zur Erklärung dieses Befundes müßte jetzt analysiert werden, ob es sich um eine allgemeine Herabsetzung der nervösen Erregbarkeit, um eine Hemmung der synaptischen Erregungsübertragung im Rückenmark (Vorderhorn) oder gar um einen hemmenden Einfluß von subcorticalen Erregungen handelt. Wir haben auf eine Analyse dieses Wirkungsmechanismus verzichtet, verweisen aber auf die Untersuchungen von ERDMANN u. SCHAEFER über den Einfluß von E 605 auf Rückenmarksreflexe. Danach scheint die geordnete Bahn nervöser Erregungsabläufe durch E 605 derartig gestört, daß kompliziertere, über mehrere Neurone ablaufende Reaktionen nicht mehr möglich sind. Ob hierbei eine Anhäufung von A.Ch. an den nervösen Synapsen zu einer Blockade (vgl. WEDENSKY-Hemmung) der Erregungsübertragung führt, kann von uns nicht entschieden werden. ENDERS führt die zentralnervös lähmende Komponente der E 605-Wirkung auf eine intracelluläre Spaltung dieses Phosphorsäureesters und ein Freiwerden von p-Nitrophenol zurück.

Zusammenfassung.

I. Versuche an Kaninchen.

a) Die Registrierung der Hirnströme während der akuten E 605-Vergiftung zeigt eine Aktivierung der 4—6 Hz-Wellen in allen corticalen Ableitungen. Unter Atemstillstand und Kreislaufkollaps tritt der Tod ohne vorherige Krampferscheinungen ein.

b) Hohe Dosen von Atropin normalisieren das klinische und hirnelektrische Vergiftungsbild.

c) Die corticale Applikation von E 605 führt zu lokalen Krampfstromabläufen. Diese können sich auf andere Hirnregionen ausbreiten.

d) Die medullären Zentren des Kaninchens scheinen gegen E 605 besonders empfindlich zu sein. Bei der Vergiftung mit E 605 verhindern vermutlich vorzeitige Blutdrucksenkung und Anoxie das Entstehen von Krämpfen.

II. Versuche an Katzen.

a) Die Registrierung der Hirnströme während der akuten E 605-Vergiftung zeigt eine Aktivierung von β -Wellen in allen Hirnteilen. In

den phylogenetisch älteren Hirnregionen kommt es bald zu Krampfstromformationen, denen klinisch extrapyramidale Symptome (Tremor, Myokloni) oder auch Krampfanfälle zu entsprechen scheinen.

b) Der weitere Vergiftungsverlauf ist durch generalisierte Krampfstromanfälle (grand-mal-Typ) mit und ohne klinisches Äquivalent gekennzeichnet.

c) Hohe Dosen von Atropin normalisieren nur das unter a) beschriebene Vergiftungsbild. Die unter b) genannten Veränderungen werden durch Atropin meist nicht mehr beeinflusst.

d) Im Hinblick auf die Anti-Cholinesterase-Wirkung von E 605 liegt die Annahme einer besonderen Acetylcholin-Empfindlichkeit der phylogenetisch älteren Hirnteile nahe.

Literatur.

- AJMONE-MARSAN, C., e M. G. F. FUORTES: *Il Lavoro Neuropsich.* **2**, 314 (1947). — ATANACKOVIC, D., et. SV. DALGAARD-MIKKELSEN: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **85**, 1 (1951). — BOVET, D., and V. G. LONGO: *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **5**, 225 (1953). — BRADLEY, P. B., and J. ELKES: *J. of Physiol.* **120**, 14 P (1953). — BRADLEY, P. B., S. CERQUIGLINI and J. ELKES: *J. of Physiol.* **121**, 51 P (1953). — CHENNELS, M., W. F. FLOYD and S. WRIGHT: *J. of Physiol.* **108**, 375 (1949). — DUBOIS, K. P., J. DOULL, P. R. SALERNO and J. M. COON: *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **95**, 79 (1949). — ENDERS, A.: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **89**, 169 (1952). — ENDERS, A., u. H. RUF: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **90**, 174 (1952). — ENDERS, A., G. KÖRTING u. D. WEILAND: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **219**, 43 (1953). — ERDMANN, W.-D., u. K. P. SCHAEFER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **1954** (im Druck). — FELDBERG, W.: *Physiologic. Rev.* **25**, 596 (1945). — FRAWLEY, J. P., E. C. HAGAN u. O. G. FITZHUGH: *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **105**, 156 (1952). — GELLHORN, E., H. M. BALLIN, C. M. RIGGLE u. E. S. REDGATE: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **90**, 101 (1952). — HAGEN, J., u. W. REINL: *Münch. med. Wschr.* **1950**, 450. — HAMBLIN, D. O., and J. F. MARCHAND: *Med. Nachr. aus den USA* **3**, 83 (1952). — HARD, W. L., and A. C. PETERSON: *Anat. Rec.* **108**, 57 (1950). — Ref. Zbl. Neur. **121**, 154 (1953). — HECHT, G.: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 783. — HECHT, G., u. W. WIRTH: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **211**, 264 (1950). — HERKEN, H., u. D. NEUBERT: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **219**, 223 (1953). — HIMWICH, H. E.: *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 228 (1953). — HOFFMANN, J.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **208**, 183 (1949). — JAETH, K.: *Dtsch. med. Wschr.* **1953**, 377. — KEMPE, H. D.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **1954** (im Druck). — KORNMÜLLER, A. E.: *Klin. Wschr.* **1953**, 228. — LEHMANN, A. J.: *Bull. New York, Acad. Med.* **25**, 386 (1949). — LEONHARDT, J.: *Arch. Toxikol.* **14**, 395 (1953). — PULVER, R., u. R. DOMENJOZ: *Experientia (Basel)* **7**, 306 (1951). — RUF, H.: *Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur.* **187**, 97 (1951). — SALERNO, P. R., and J. M. COON: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **84**, 227 (1950). — VOGEL, G.: *Arch. Toxikol.* **14**, 381 (1953). — WESCOE, W. C., R. E. GREEN, B. P. McNAMARA and S. KROP: *J. Pharmacol. a. Exper. Ther.* **92**, 63 (1948). — WILHELMI, G., and R. DOMENJOZ: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **86**, 321 (1951).

Professor Dr. F. DUENSING, Göttingen, Neurol. Universitäts-Klinik, und
Dr. W.-D. ERDMANN, Göttingen, Pharmacol. Institut d. Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. LENDLE).

Über die Wirkung von Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat (E 605) auf Rückenmarksreflexe an der Katze.

Von
W.-D. ERDMANN und K. P. SCHAEFER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juni 1954.)

Die akute Vergiftung mit dem zur Schädlingsbekämpfung geeigneten Cholinesterasegift E 605 („Parathion“, Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat) führt am Warmblüter zu starken Erregungserscheinungen im Gebiet der parasympathisch innervierten Erfolgsorgane. Darüber hinaus kommt es auch zu zentralnervösen Symptomen, wobei je nach Tierart und Individuum motorische Erregungen oder Lähmungen im Vordergrund des Vergiftungsbildes stehen.

Die elektroencephalographische Kontrolle des Vergiftungsverlaufes an Katzen (ENDERS u. RUF, DUENSING u. ERDMANN) läßt als Substrat der motorischen *Erregungen* (extra pyramidale Symptome, Krampfanfälle) entsprechende hirnelektrische Veränderungen (Aktivierung, Krampfstromabläufe) erkennen. Für motorische *Lähmungen* konnte jedoch kein elektroencephalographisches Äquivalent gefunden werden. DUENSING u. ERDMANN haben beobachtet, daß schwerste, durch E 605 ausgelöste hirnelektrische Krampfanfälle klinisch häufig mit völliger motorischer Ruhe einhergehen. Da die indirekte Muskeleerregbarkeit unter E 605 erhalten bleibt, könnte hierbei eine Blockade der synaptischen Erregungsübertragung im Bereich des Rückenmarks in Betracht gezogen werden. Ein solcher Wirkungsmechanismus wäre schon deswegen prinzipiell möglich, weil E 605 als Hemmstoff der Cholinesterase zu den Synapsengiften gehört. Vielleicht spricht für einen Angriffspunkt im Rückenmark auch der Befund (DUENSING u. ERDMANN), daß die Reizzeitstromstärkekurve für eine motorische Reaktion bei umschriebener bipolarer Reizung der Präzentralregion durch E 605 zur Seite höherer Stromstärken hin verschoben wird.

Die genannten Befunde ließen eine Überprüfung der Rückenmarksfunktion unter E 605 notwendig erscheinen. Für die tierexperimentelle Untersuchung waren dabei 3 Forderungen zu erfüllen:

1. Ein Narkoseeinfluß auf den Vergiftungsverlauf mußte vermieden werden. Die Versuche wurden daher nur an decerebrierten Tieren durchgeführt.
2. Es sollte nicht nur das Verhalten monosynaptischer Reflexe (z. B. Patellar-schnenreflex) geprüft werden, da diese Reflexe nicht ohne Berücksichtigung der

Einflüsse höherer Zentren zu beurteilen sind. Es wurde daher neben dem Patellar-sehnenreflex auch das Verhalten polysynaptischer Reflexe (homolateraler Beuge-reflex, kontralateraler Streckreflex) bei fortschreitender E 605-Vergiftung kontrolliert.

3. Die Abhängigkeit der Reflexerregbarkeit von den allgemeinen Kreislaufbedingungen machte eine fortlaufende Kontrolle des arteriellen Blutdruckes notwendig.

Methodik.

Methodisch folgten wir weitgehend der von TAUGNER u. CULP angegebenen Versuchsanordnung. Als Versuchstiere dienten 33 Katzen im Gewicht von 2,1 bis 4,2 kg. Die Tiere wurden in Äthernarkose nach SHERRINGTON decerebriert und künstlich beatmet. In einem Teil der Versuche wurde unmittelbar nach der Decerebrierung — seltener 24 Std zuvor — das Rückenmark im Bereich der mittleren (Th 8) bis unteren Thorakalsegmente (Th 12) durchtrennt. In die A. carotis comm. sin. wurde eine Kanüle zum Anschluß an eine Blutdruckregistrierung eingebunden. Das Registriersystem war zur Verhinderung der Blutgerinnung mit Liquemin¹-RINGER-Lösung gefüllt. Die i.v. Injektionen erfolgten in die V. jugularis ext. dextra. Nach der Operation ließen wir bis Versuchsbeginn 2—3 Std verstreichen.

Registriert wurden neben dem arteriellen Blutdruck A. der homolaterale Beugereflex (HBR) und der kontralaterale Streckreflex (CSR) sowie B. der Patellarsehnenreflex (PSR) und der Erfolg der indirekten Muskelreizung. Die Fixierung der Tiere erfolgte durch Stahldrähte, die in Hüfthöhe durch die hinteren Wirbelsäulenbänder sowie durch beide Kniegelenke getrieben wurden und in Kürschnerbügeln eingespannt waren. Als Ausdruck der Reflextätigkeit wurden die Bewegungen der Unterschenkel der hinteren Extremitäten aufgezeichnet. Hierzu wurden Fäden durch Naht am oberen Sprunggelenk befestigt und über Rollen mit (semi-) isometrischen Hebeln verbunden. Die Ausschlagshöhe konnte durch Hebelübertragung und Federverstärkung reguliert werden.

A. Die Auslösung des HBR und CSR erfolgte durch supramaximale elektrische Reizung der zentralen Stümpfe der N. tibialis und fibularis, die in nach außen isolierte Platinelektroden eingebettet waren. Gereizt wurde mit einem Rechteckimpuls-Generator (Megatest²), wobei der Reizstromkreis alle 2 min für 2 sec geschlossen wurde. Die Dauer des Einzelimpulses betrug 0,2—2 msec, die Reizfrequenz 30/sec, die Reizstärke 3—5 mA. Durch Stromschleifen bedingte Reizwirkungen konnten ausgeschlossen werden. Auf der Seite der Elektroden (HBR) wurden die NN. obturatorius und femoralis, auf der Gegenseite (CSR und PSR) die Nn. ischiadicus, obturatorius und saphenus möglichst weit proximal durchtrennt. Zwischen den elektrischen Reizungen wurde gelegentlich auch der PSR ausgelöst.

B. Zur Auslösung des PSR diente ein fixierter Reflexhammer, der alle 1—2 min ausgeklinkt wurde. Auf der gleichen Seite waren die Nn. obturatorius, ischiadicus und saphenus durchschnitten. Auf der Gegenseite erfolgte über den peripheren Stumpf des N. tibialis die indirekte Reizung des M. gastrocnemius, dessen Kontraktionen (semi-)isometrisch registriert wurden.

¹ Liquemin = Heparin. Wir danken der Fa. Hoffmann La Roche für die Überlassung der Versuchsmengen.

² Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung des Reizgerätes als Leihgabe.

Um peripher bedingte Wirkungen von E 605 mit Sicherheit ausschließen zu können, erwies es sich als notwendig, eine Versuchsanordnung zu wählen, bei der das Erfolgsorgan von einer Spenderkatze isoliert durchströmt wurde. Hierzu wurde das Bein im proximalen Bereiche des Oberschenkels unter Schonung des N. ischiadicus abgebunden. Zur Durchströmung wurden mit Hilfe von Polyäthylenschläuchen Anastomosen zwischen der heparinisierten Spenderkatze (A. carotis comm., V. jugularis ext.) und dem isolierten Bein (A. femoralis, V. femoralis) hergestellt. Registriert wurden die durch kontralaterale Ischiadicusreizung ausgelösten Kontraktionen des von der Spenderkatze durchbluteten m. gastrocnemius.

Zur i.v. Injektion wurde der Wirkstoff E 605¹ als 1%ige Lösung in absolutem Alkohol verwendet.

Ergebnisse.

Eine i.v. Stoßinjektion selbst kleiner Mengen von E 605 (1 mg/kg) führt zu vorübergehendem Blutdrucksturz, der allein Ursache einer Veränderung der Reflexaktivität sein kann. Da die protrahierte i.v. Injektion entsprechenden Dosen von E 605 demgegenüber meist keine Blutdrucksenkung hervorruft, gehörten langsame (0,2 cm³ der 1%igen E 605-Lösung in 30 sec) und fraktionierte (1 mg/kg E 605 alle 4 min) Injektionen zu unseren Versuchsbedingungen.

KATZE 31 Decerebrierung
htr. vord. Vierhügel.

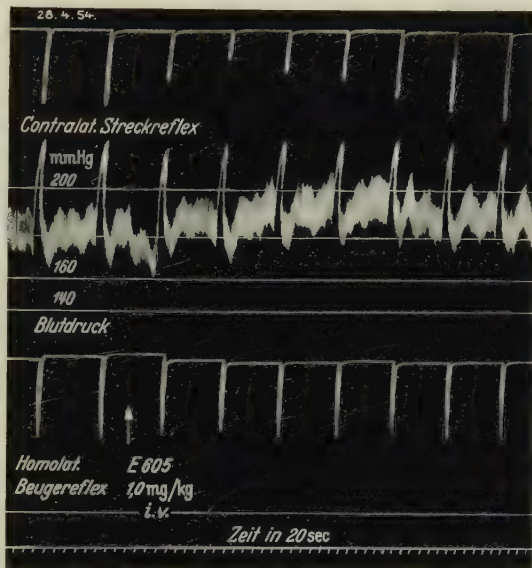


Abb. 1. Versuch vom 28. 4. 1954. Katze, Gewicht 3,3 kg. Decerebriert und künstlich beatmet. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Die Wirkung von 1 mg/kg E 605 i.v. auf CSR, HBR und Blutdruck.

A. Die Wirkung von E 605 auf polysynaptische Reflexe (CSR u. HBR).

Nach einmaliger i.v. Injektion von 1 mg/kg E 605 zeigen sich bereits die ersten Veränderungen polysynaptischer Reflexe (Abb. 1). Es kommt zu einer stets deutlichen (über 50%) Hemmung des CSR, während die Amplitude des HBR meist nur geringfügig und kurzfristig eingeschränkt wird (11 Versuche). Die Dauer dieser akuten Wirkung beträgt etwa 10 min. Fortlaufende Injektionen von E 605 (alle 4 min 1 mg/kg) führen mit insgesamt 6 mg/kg zu einer Lähmung des CSR (10 Versuche). Auch hierbei zeigt sich wieder eine geringere Empfindlichkeit des HBR, der

¹ Wir danken der Firma Bayer für die Überlassung der Versuchsmengen von E 605.

zu diesem Zeitpunkt nur wenig beeinflußt zu sein pflegt und erst nach höheren Dosen von E 605 (insgesamt 10 mg/kg) verschwindet (vgl. Abb. 2).

Zur Sicherung einer tatsächlich im Rückenmark lokalisierten E 605-Wirkung mußten Einflüsse höherer Zentren des ZNS (1.) und eventuell überlagerte periphere Wirkungen (2.) ausgeschlossen werden.

KATZE 33

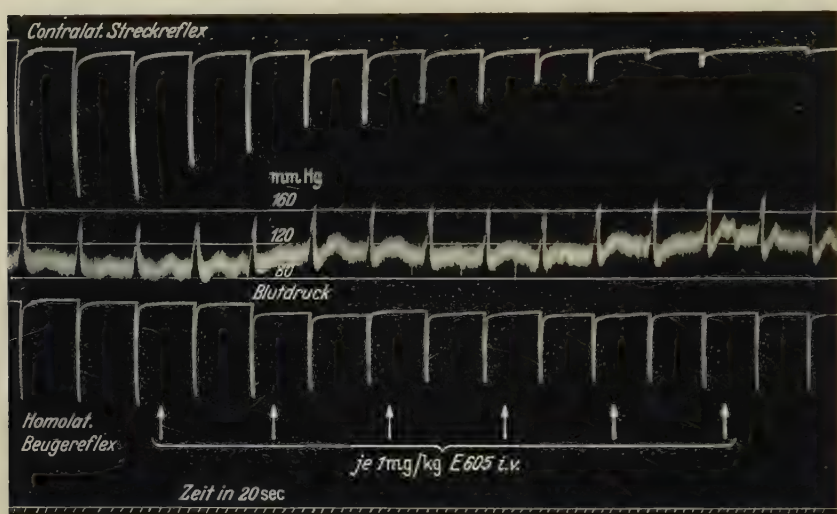
5. 5. 1954
Decerebriert

Abb. 2. Versuch vom 5. 5. 1954. Katze, Gewicht 2,2 kg. Decerebriert und künstlich beatmet. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Die Wirkung fortschreitender E 605-Vergiftung (insgesamt 6 mg/kg E 605 i.v.) auf CSR, HBR und Blutdruck.

Zu 1.: In ergänzenden Versuchen wurde die Wirkung von E 605 auf polysynaptische Reflexe an tiefspinalen Tieren geprüft. Dabei zeigten sich keine Unterschiede gegenüber den oben beschriebenen Ergebnissen an Tieren mit intaktem Rückenmark.

Zu 2.: In zahlreichen Versuchen wurde die Wirkung von E 605 auf den Erfolg indirekter Muskelreizung kontrolliert (vgl. Abb. 3). Die von uns geprüften E 605-Dosen zeigten hierbei keine periphere Wirkung. Es war jedoch an die Möglichkeit einer frequenzabhängigen, maskierten Hemmung der neuromuskulären Erregungsübertragung zu denken.

Die vom Rückenmark ausgehenden reflektorischen Impulsfrequenzen entsprechen sicher nicht der von uns für die indirekte Muskelreizung verwendeten Reizfrequenz von 30/sec. Es ist jedoch durchaus möglich, daß eine durch Cholinesterasehemmung bewirkte Acetylcholinanhäufung an der motorischen Endplatte bei einer höheren als der von uns gewählten Impulsfolge sehr schnell zu einer WEDENSKY-Hemmung führt. Für Prostigmin und Eserin sind derartige Befunde bekannt (vgl. RIESSER, NAEß u. v. a.).

Um experimentell ein Angreifen von E 605 an der neuromuskulären Synapse zu verhindern, wurden 3 ergänzende Versuche bei isolierter Durchströmung (Spenderkatze) des Erfolgsorganes für den CSR durchgeführt. Die dabei notwendige Abbindung des Oberschenkels zwang zur Registrierung des isolierten m. gastrocnemius (nicht des ganzen Beines!). Es zeigte sich, daß E 605 in einer Dosierung von 1—3 mg/kg i. v. den CSR aufhebt. Dieses Ergebnis entspricht der E 605-Wirkung auf den CSR des m. gastrocnemius am nicht isoliert durchströmten Bein (6 Kontrollversuche).

Mit diesen Befunden scheint uns erwiesen, daß die Hemmung polysynaptischer Reflexe durch E 605 auf einem Angriffspunkt im Bereich des Rückenmarks selbst beruht. Für eine weitere Analyse mußte auch das Verhalten des PSR unter E 605 in die Untersuchung miteinbezogen werden.

B. Die Wirkung von E 605 auf den monosynaptischen Reflex (PSR).

Mit der i.v. Injektion von 1 mg/kg E 605 beginnen die ersten sichtbaren Veränderungen des monosynaptischen PSR. Sofort nach der Injektion kommt es zu einer meist nur kurzfristigen Abschwächung (4 Versuche), die bei wiederholten E 605-Gaben verstärkt in Erscheinung tritt (Abb. 3). Die Dauer der akuten reflexhemmenden Wirkung schwankt zwischen 2 und 6 min. Bei fortlaufenden Injektionen von E 605 (alle

KATZE 39

20. 5. 54
Decerebriert

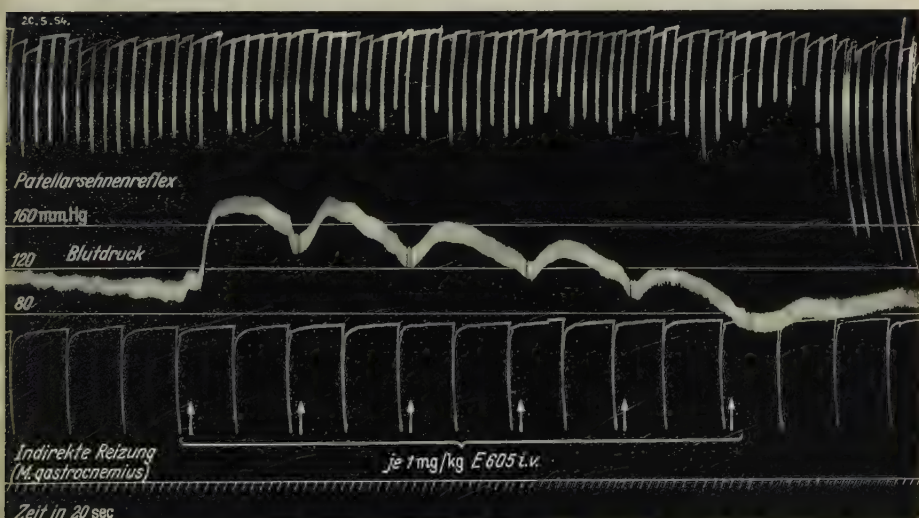


Abb. 3. Versuch vom 20. 5. 1954. Katze, Gewicht 2,3 kg. Decerebriert und künstlich beatmet. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Die Wirkung fortschreitender E 605-Vergiftung (insgesamt 6 mg/kg E 605 i.v.) auf PSR, indirekte Muskelreizung und Blutdruck.

4 min 1 mg/kg i.v.) zeigt sich somit meistens die Tendenz einer zunehmenden Einschränkung des PSR, der aber selten völlig aufgehoben wird. Nach insgesamt 6 mg/kg E 605 wird regelmäßig eine plötzlich einsetzende, erhebliche Steigerung des PSR (6 Versuche) beobachtet. Gleichzeitig zeigen sich erste Anzeichen einer extrapyramidalen Erregung (Tonuszunahme, Myokloni). Es ist interessant, daß die Steigerung des monosynaptischen Reflexes also genau mit dem Zeitpunkt der Lähmung des polysynaptischen Extensorreflexes (vgl. Abb. 2) zusammenfällt. Dies haben wir auch in Versuchen bei gleichzeitiger Registrierung von mono- und polysynaptischen Reflexen feststellen können. Der PSR pflegt erst im letalen Stadium der E 605-Vergiftung — und zwar verbunden mit einer Abnahme des Blutdrucks unter 50 mm Hg — zu verschwinden.

Der monosynaptische Reflex ist bekanntlich in hohem Maße von dem Erregungszustand übergeordneter Zentren abhängig. Um einen derartigen Einfluß auf den PSR auszuschalten, wurde in 3 ergänzenden Versuchen die Wirkung von E 605 auf den PSR an tiefspinalen Tieren geprüft. Dabei ergaben sich keine Unterschiede gegenüber den zuvor mitgeteilten Befunden an Tieren mit intaktem Rückenmark. Selbstverständlich zeigten sich bei dieser Versuchsanordnung keinerlei Symptome einer extrapyramidalen Erregung.

Da ein Einfluß von E 605 auf die neuromuskuläre Synapse durch die bereits mitgeteilten Befunde (siehe unter A) praktisch ausgeschlossen wurde, erübrigt sich hier die nähere Berücksichtigung einer peripheren Wirkung von E 605. Somit erscheint uns auch für die Veränderungen des PSR unter E 605 das Rückenmark selbst verantwortlich zu sein.

Im Zusammenhang mit den erwähnten tonischen Reaktionen extrapyramidalen Charakters, die im Verlaufe der Vergiftung mit E 605 aufzutreten pflegen, seien an dieser Stelle einige ergänzende Befunde genannt. Es zeigte sich nämlich, daß das frühzeitige Auftreten und die Ausprägung solcher Reaktionen außerordentlich stark von der Schnittführung bei der Decerebrierung abhängen. So konnten insbesondere die durch E 605 vorzeitig (d. h. schon mit 1—3 mg/kg E 605) ausgelösten extrapyramidalen Erregungserscheinungen durch oberflächliches Abtragen der bei der Decerebrierung entstandenen Schnittebene des Mittelhirns regelmäßig gelöscht werden. Den gleichen Erfolg hatte die i.v. Injektion von 1—2 mg/kg Atropin. Die geprüften spinalen Reflexe selbst werden durch diese Maßnahmen, insbesondere auch durch Atropininjektion, offenbar nicht beeinflusst.

C. Die Wirkung von E 605 auf Rückenmarksreflexe unter verschiedenen pharmakologischen Bedingungen.

Möglicherweise stellt die eben beschriebene, allgemein reflexhemmende Wirkung geringer E 605-Dosen die funktionelle Grundlage der im klinischen Vergiftungsbild geläufigen motorischen Lähmungen dar. Unter dieser Voraussetzung gewinnt die zunächst theoretische Frage nach wirksamen Mitteln zur Bekämpfung der drohenden Rückenmarkslähmung auch ein klinisch therapeutisches Interesse. Bei Berücksichtigung dieses praktischen Gesichtspunktes erschien uns weniger die

Prüfung einer eventuellen Schutzwirkung¹ als vielmehr die Prüfung von Stoffen, die die lähmende Wirkung von E 605 auf das Rückenmark durchbrechen können, bedeutungsvoll.

Es zeigte sich, daß diejenigen Substanzen, die die durch E 605 ausgelösten *Erregungserscheinungen* zu dämpfen vermögen, auf *lähmende* E 605-Wirkungen keinen Einfluß haben. So gelang es uns nicht, mit Atropin (1—3 mg/kg i.v.), Novocain (10—20 mg/kg i.v.), Parpanit (2 mg/kg i.v.), d-Tubocurarin (0,5 mg/kg i.v.), Eserin (0,5—3 mg/kg

KATZE 33 *Decerebriert*
5. 5. 1954 unmittelbar nach

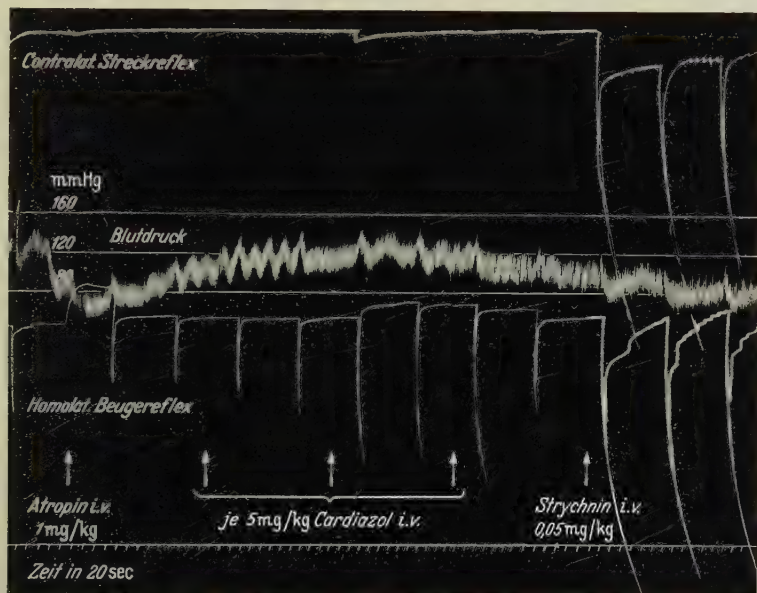


Abb. 4. Versuch von 5. 5. 1954. Katze, Gewicht 2,2 kg. Decerebriert und künstlich beatmet. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Die Wirkung von Atropin (1 mg/kg i.v.), Cardiazol (3×5 mg/kg i.v.) und Strychnin (0,05 mg/kg i.v.) auf CSR, HBR und Blutdruck am mit E 605 vergifteten Tier (Fortsetzung des Versuches von Abb. 2).

i.v.) oder Prostigmin (0,1 mg/kg i.v.) eine Reflexhemmung aufzuheben (auch nicht in der Versuchsanordnung mit isoliert durchströmtem Hinterbein). Auch mit Adrenalin (3—6 γ /kg/min), Sympatol (7 bis 15 mg/kg i.v.) und Succinylcholin (0,2—0,8 mg/kg i.v.) ließen sich keine therapeutischen Wirkungen gegen die Rückenmarkslähmung unter E 605 erzielen. Zum Teil besaßen die geprüften Stoffe sogar additive Wirkungen (besonders Parpanit).

¹ Eine begrenzte Schutzwirkung gegen die E 605-Vergiftung durch Vorbehandlung mit Eserin oder Atropin ist verschiedentlich beschrieben worden (vgl. SALERNO u. COON, HECHT u. WIRTH u. a.).

Von den als zentralnervöse Krampfgifte bekannten Substanzen Cardiazol, Strychnin und Nicotin war dagegen eher eine antagonistische Wirksamkeit gegen die durch E 605 bedingte Reflexhemmung zu erwarten. Hierbei erwies sich *Cardiazol* (5—15 mg/kg i.v.) nur begrenzt im Sinne einer Reflexverstärkung wirksam, nämlich solange der Reflex durch E 605 noch nicht völlig aufgehoben war (vgl. Abb. 4). Mit *Strychnin* (0,03—0,05 mg/kg i.v.) konnte dagegen jede Reflexhemmung oder -lähmung augenblicklich aufgehoben werden. *Nicotin* hatte nur kurzfristige, aber ausgesprochen antagonistische Wirkungen, indem es die Hemmung oder Lähmung der polysynaptischen Reflexe aufhob und gleichzeitig den unter E 605 verstärkten PSR hemmte.

D. Die Wirkung von E 605 auf das Rückenmark des Frosches¹.

Die an der Katze nachweisbar lähmende Wirkung von E 605 auf das Rückenmark legte den Gedanken nahe, daß die motorischen Lähmungen am E 605-vergifteten Kaltblüter (vgl. ENDERS u. RUF, DUENSING u. ERDMANN) ebenfalls einem Angriffspunkt am Rückenmark zuzuschreiben sind. Für die Richtigkeit dieser Annahme sprachen schon orientierende Versuche an Fröschen, die mit toxischen E 605-Dosen vorbehandelt waren: Im Zustande völliger motorischer Lähmung war die indirekte Erregbarkeit der Muskulatur erhalten. Der Nachweis eines spezifischen Angriffspunktes am Rückenmark war jedoch nur mit Hilfe einer geeigneten Reflexprüfung möglich.

Methodisch gingen wir dabei folgendermaßen vor:

An 12—24 Std zuvor decerebrierten Eskulenten wurde der Thorax gefenstert und eine feine Kanüle zur intraarteriellen Injektion von E 605 in die re. Aorta (bei erhaltener Durchblutung) eingestochen. Registriert wurde der durch kontralaterale Reizung des zentralen Ischiadicusstumpfes ausgelöste Reflex des isolierten m. gastrocnemius. Zur Vermeidung peripherer E 605-Wirkungen wurde das abdominelle Gefäßbündel unterbunden. In einigen Versuchen wurde zusätzlich der gesamte Unterleib — mit Ausnahme des n. ischiadicus — abgetrennt.

Die intraarterielle Injektion einer Grenzdosis von 0,1 mg E 605 führte zu einer sofortigen Lähmung des kontralateralen Streckreflexes (Abb. 5). Die eingetretene Rückenmarkslähmung war durch intraarterielle Injektion von Strychnin (10—20 γ) zu beseitigen. Zur Bestimmung der für eine Rückenmarkslähmung notwendigen Grenzkonzentrationen von E 605 war eine lokale Applikation von E 605 auf das Rückenmark erforderlich.

An decerebrierten Fröschen wurde das Abdomen eröffnet und das abdominelle Gefäßbündel unterbunden. Nach Seitwärtsverlagerung der Eingeweide wurden die Wirbelsäule freigelegt und die Körper des 5. bis 6. Wirbels mit Skalpell und Schere

¹ Die in diesen Versuchen verwendeten E 605-Konzentrationen wurden aus einer 10%igen alkoholischen Stammlösung durch Verdünnung mit Propylenglykol oder mit Adhagon-RINGER-Lösung (vgl. DUENSING u. ERDMANN) hergestellt.

vorsichtig aus ihren knöchernen Verbindungen gelöst. Die geprüften E 605-Konzentrationen wurden auf das freiliegende Rückenmark direkt aufgebracht. Auslösung und Registrierung des kontralateralen Streckreflexes erfolgten in der zuvor beschriebenen Weise. Derartige Präparate waren bei Zimmertemperatur durchschnittlich 1 Std lang brauchbar.

Die lokale Einwirkung von E 605 auf das Rückenmark führt in Abhängigkeit von der Konzentration und Einwirkungsdauer zur Lähmung des kontralateralen Streckreflexes. Mit Konzentrationen von 10^{-4} kommt es nach 10—15 min zu einer deutlicher Verminderung des Reflexes. Nach 20 min ist der Reflex erloschen. Mit höheren Konzentrationen

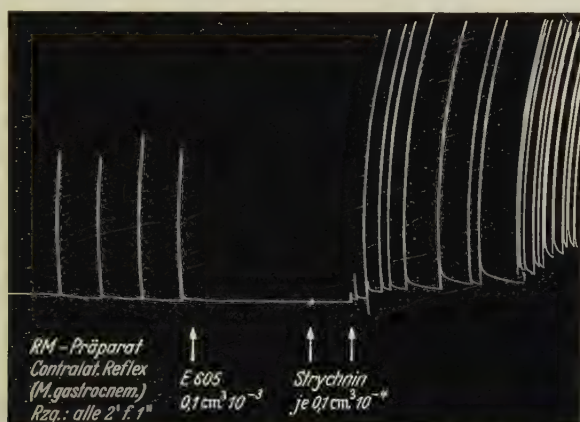


Abb. 5. Versuch vom 12. 4. 1954. R. esculenta. Decerebriert. Technik der Registrierung: vgl. im Text. Die Wirkung intraarterieller Injektionen von E 605 (0,1 mg) und Strychnin ($2 \times 0,01 \text{ mg}$) auf den kontralateralen Streckreflex (Reizung alle 2 min für je 1 sec).

tritt die Rückenmarkslähmung schneller und stärker hervor. Die lokale Applikation von Strychnin (10^{-3}) nach eingetretener Lähmung führt in jedem Falle zu einer Wiederherstellung der Reflexe und zu spontanen Erregungserscheinungen, was wir als Beweis für die noch vorhandene Funktionstüchtigkeit des Präparates ansahen.

Diskussion.

Die kritische Beurteilung unserer Ergebnisse wird zunächst 3 Gesichtspunkte zu berücksichtigen haben:

1. Zusammenhänge zwischen der Wirkung von E 605 auf Rückenmarksreflexe und den jeweils bestehenden Kreislaufbedingungen,
2. die Frage der gewählten Dosierung und Applikationsform von E 605 und
3. die Eignung der von uns gewählten Reizbedingungen für die Auslösung der geprüften Reflexe.

Zu 1. Bei der Prüfung von spinalen Reflexen ist darauf zu achten, daß der arterielle Blutdruck nicht unter die von KOLL angegebene Schwelle von 50 mm Hg absinkt. Die durch Asphyxie bedingten Auswirkungen auf die Reflexaktivität sind von BROOKS u. KOIZUMI beschrieben worden. Wir haben zur Vermeidung von Fehlergebnissen daher grundsätzlich nur solche Versuche ausgewertet, in denen der Blutdruck noch nicht unter 70–80 mm Hg abgesunken war.

Die von uns gewählte Injektionstechnik führte in den meisten Fällen zu Blutdrucksteigerungen. Im Hinblick auf die Anti-Cholinesterasewirkung von E 605 liegt es nahe, als Ursache für den Blutdruckanstieg eine Ausschüttung von Adrenalin aus den Nebennieren verantwortlich zu machen, die ihrerseits zu Veränderungen der Reflexaktivität zu führen vermag (vgl. BÜLBRING, BURN u. SKOGLUND). Einer solchen Annahme widerspricht jedoch, daß die von uns beobachteten Reflexänderungen mit den eventuell zu erwartenden Adrenalinwirkungen auf das Rückenmark nicht übereinstimmen, und daß die Blutdrucksteigerung nach E 605 stets mit einer Bradykardie (statt mit einer Tachykardie) einhergeht. Danach muß also an die Möglichkeit einer eigenen sympathicomimetischen Wirksamkeit von E 605 auf das Gefäßsystem gedacht werden. Derartige Kreislaufwirkungen sind von SALERNO für andere Anti-Cholinesterasen (HETP, TEPP und Eserin) beschrieben und als direkte Erregung sympathischer Ganglien gedeutet worden. Im Hinblick auf die erregende Wirkung von E 605 auf das Atemzentrum (ERDMANN, KEMPE, LÜHNING) erscheint uns jedoch die Möglichkeit einer zentralen Vasomotorenerregung für die Deutung der beschriebenen Blutdruckwirkung von E 605 nicht ausgeschlossen.

Zu 2. Die Prüfung von Substanzen mit Rückenmarkswirkung wird im allgemeinen so durchgeführt, daß man die Stoffe intraarteriell injiziert, um eine streng lokalisierte Wirkung auf die geprüften Reflexzentren zu erhalten. Wir haben auf diese Methode bewußt verzichtet und stattdessen die i.v. Giftzufuhr gewählt. Zur Lokalisierung eines Angriffspunktes im Rückenmark bedienen wir uns anderer Methoden (isolierte Durchströmung des Erfolgsbeines, tiefspinale Durchtrennung usw.). Die i.v. Applikation erlaubte, Veränderungen der Reflexaktivität im Rahmen der Allgemeinvergiftung mit E 605 erfassen zu können. Außerdem war hierbei ein Vergleich der das Rückenmark lähmenden Dosis von E 605 mit den bei der Toxizitätsbestimmung ermittelten Giftmengen möglich.

Die in unseren Versuchen beobachteten Letaldosen stimmen mit den НЕСАТ u. WIRTH angegebenen Werten von 15 mg/kg E 605 gut überein. Die den polysynaptischen Reflex lähmenden Giftmengen (6–10 mg/kg) liegen demnach im Bereich der halben Letaldosis.

Auch am Frosch fanden sich vergleichbare Werte der das Rückenmark lähmenden Grenzkonzentrationen von E 605, die sowohl bei lokaler Einwirkung wie bei Injektion von 100 mg/kg E 605 in den Lymphsack (unter Annahme gleichmäßiger Verteilung!) 1:10000 beträgt.

Zu 3. Die von uns benutzte Versuchsanordnung erlaubte es nicht, die polysynaptische und monosynaptische Reflexaktivität unter gleichen Reizbedingungen zu erfassen. Während zur Auslösung polysynaptischer Reflexe *supramaximale* Reizungen durchgeführt werden konnten, war diese Voraussetzung bei der mechanischen Auslösung des Kniesehenreflexes nicht mit Sicherheit erfüllt, so daß hier eventuelle Veränderungen der Reflexerregbarkeit Einfluß auf den Reizerfolg haben könnten. Eine Fehlbeurteilung der monosynaptischen Reflexaktivität wird mit Sicherheit nur durch die Anwendung oszillographischer Methoden (Ableitung der Vorderwurzelpotentialle bei Reizung der entsprechenden Hinterwurzel) vermieden.

Die von uns durchgeführten Reflexuntersuchungen zeigen, daß E 605 in geringen Dosen (etwa 3 mg/kg i.v.) die geprüften Reflexe ganz unterschiedlich beeinflusst: Der aus den meisten Neuronen bestehende CSR wird stark abgeschwächt, der aus weniger Neuronen bestehende HBR geringfügig vermindert und der aus nur 2 Neuronen bestehende PSR kaum beeinflusst. Im Augenblick einer kompletten Lähmung des polysynaptischen CSR (etwa 6 mg/kg E 605 i.v.) tritt dann überraschend eine Steigerung des monosynaptischen PSR hervor. Daß es sich bei diesen Ergebnissen um echte Rückenmark-Wirkungen von E 605 handelt, konnte mit Hilfe geeigneter Methoden nachgewiesen werden. Nur die gefundene Steigerung des PSR wird vielleicht mit gewisser Zurückhaltung zu betrachten sein, weil hierbei periphere Einflüsse im Sinne einer Erregbarkeitssteigerung (der Muskelspindeln) nicht ausgeschlossen sind (siehe oben).

Bei dem Versuche einer Deutung der erhaltenen Befunde liegt es nahe, die cholinesterasehemmenden Eigenschaften von E 605 für seine zentralnervösen Wirkungen verantwortlich zu machen. Diese Betrachtungsweise zwingt zu einem Vergleich mit den Rückenmark-Wirkungen anderer Cholinesterasegifte, wie Eserin (SCHWEITZER u. WRIGHT, 1937; MERLIS u. LAWSON, 1939; BÜLBRING u. BURN, 1941; WIKLER, 1945; CALMA u. WRIGHT, 1947; TAVERNER, 1954), DFP (CHENNELLS u. Mitarb., 1951; HOLMSTEDT, 1954) oder Tabun (SKOGLUND, 1952; HOLMSTEDT, 1954). Obwohl die Einzelergebnisse der verschiedenen Autoren (vgl. TAVERNER, 1954) zum Teil stark voneinander abweichen (namentlich im Hinblick auf die Beeinflussung monosynaptischer Reflexe), sind in fast allen Untersuchungen übereinstimmend *Steigerungen der polysynaptischen Reflexe* gefunden worden. Die polysynaptischen Reflexe werden durch E 605 aber mit Sicherheit *gelähmt*. Wenn es richtig ist, daß die zentralnervösen Wirkungen von Anti-Cholinesterasen wie z. B. Eserin Folge ihrer cholinesterasehemmenden Eigenschaften sind, so können die gefundenen Wirkungen von E 605 auf die Reflexaktivität sicher nicht auf dem gleichen Mechanismus beruhen.

Von SCHWEITZER u. Mitarb. wurde die Möglichkeit diskutiert, daß Anti-Cholinesterasen in Abhängigkeit von ihrer Lipoidlöslichkeit zu spinaler Erregung (vgl. Eserin) oder Lähmung (vgl. Prostigmin) führen. E 605 gehört wie Eserin zwar zu den lipidlöslichen Substanzen, seine Wirkungen auf die Reflexaktivität entsprechen aber weitgehend denen von Prostigmin (eigene unveröffentlichte Befunde). Die Theorie der spinalen Wirkungsbedingungen für Anti-Cholinesterasen kann also im Falle des E 605 nicht befriedigen, vielleicht weil die cholinesterasehemmenden Wirkungen nicht im Vordergrund der zentralnervösen E 605-Wirkung stehen.

Unsere Versuche, die durch E 605 bedingten Reflexveränderungen antagonistisch zu beeinflussen, haben zu *theoretisch* und *praktisch* verwertbaren Ergebnissen geführt:

Theoretisch bedeutungsvoll erscheint uns die Tatsache einer ausgesprochenen antagonistischen Wirksamkeit von *Nicotin*. Die Eigenwirkungen von Nicotin auf die Reflexaktivität sind von TAUGNER u. CULP geprüft worden. Danach führt Nicotin — im direkten Gegensatz zu E 605 — zu einer Lähmung des monosynaptischen Reflexes und einer Steigerung der polysynaptischen Reflexe. TAUGNER u. CULP fassen diese Nicotinwirkung als Ausdruck einer erhöhten Interneuronenaktivität auf. Die Lähmung des PSR wird dabei als Folge einer Erregung von Interneuronen, die eine hemmende Wirkung auf diesen Reflex entfalten, angesehen. Umgekehrt könnte man auf Grund des Antagonismus zwischen E 605 und Nicotin¹ folgern, daß E 605 im Rückenmark als ein Interneuronengift wirkt (vgl. auch Addition mit anderen Interneuronengiften wie Parpanit!). Es ist demnach verständlich, wenn E 605 die polysynaptischen Reflexe in der Reihenfolge ihrer Kompliziertheit ausschaltet. Die durch E 605 bedingte Steigerung des PSR könnte dementsprechend auf einer Lähmung von Interneuronen, die diesen Reflex hemmen, beruhen. Auf unsere Bedenken hinsichtlich einer Deutung der den PSR steigernden E 605-Wirkung ist bereits hingewiesen worden. Auch bei der Diskussion einer interneuronalen „Lähmung von Hemmungen“ erscheint eine gewisse Zurückhaltung notwendig.

KOLL betont, daß die Impulse der Pyramidenbahn noch ein „Binnen-systemneuron“ (von MONAKOW) zu passieren haben, bevor sie das motorische Neuron selbst erreichen. Wenn diese Annahme zutrifft, so würde also für corticale Impulse ein Weg über mehrere Synapsen erforderlich sein. Damit wäre auch hier ein Angriffspunkt für das Interneuronengift E 605 gegeben. Die eingangs erwähnten Befunde von DUENSING u. ERDMANN, die an die Möglichkeit einer durch E 605 bedingten Unterbrechung der motorischen Bahn im Rückenmark denken ließen (elektroencephalographischen Krampfanfälle ohne klinisches Äquivalent usw.), könnten vielleicht so erklärt werden. Andererseits waren die von DUENSING u. ERDMANN verwendeten E 605-Dosen so hoch (50 mg/kg), daß wohl auch die Möglichkeit einer lähmenden Wirkung auf die motorischen Vorderhornzellen diskutiert werden kann.

Im Zusammenhang mit dem von uns gefundenen spinalen Antagonismus zwischen E 605 und *Strychnin* sowie zwischen E 605 und *Cardiazol* sind die grundlegenden Untersuchungen von KOLL über die Lokalisation der *Strychnin*- und *Cardiazol*wirkung wesentlich. Nach KOLL greift *Strychnin* an den „intraspinalen Schaltzellen im receptorischen Teil des Reflexbogens“ an, während der Angriffspunkt von *Cardiazol* „im moto-

¹ Die Einteilung der E 605-Wirkungen in „muscarinartige“ und „nicotinartige“ Einzelwirkungen (LEHMANN) ist also insofern nicht ganz zutreffend, als sich Nicotin- und E 605-Wirkungen im Bereich des Rückenmarks sogar antagonistisch beeinflussen.

rischen Teil des Reflexbogens, ventral von der Einmündungsstelle der Pyramidenbahn“ gelegen ist. Es erscheint verständlich, daß unter diesen Umständen Cardiazol nur dann zu einer Verstärkung der Reflexaktivität führen kann, wenn der Reflexbogen noch nicht vollständig unterbrochen ist (vgl. HBR und CSR in Abb. 4). Demgegenüber vermag Strychnin auch einen bereits blockierten Reflexbogen zu reaktivieren, solange die Lähmung nicht den motorischen Teil des Reflexes selbst betrifft (vgl. Abb. 4). Hinsichtlich der Wirkung von Strychnin auf die Interneuronen des Rückenmarks sei auch auf die zusammenfassende Darstellung von BROOKS u. KOIZUMI verwiesen.

Die antagonistische Wirkung sehr kleiner Strychninmengen (0,03 bis 0,05 mg/kg) ist vielleicht auch von *praktischer* Bedeutung. Da die i.v. Injektion von Strychnin in Dosen, die noch weit unter der Krampfschwelle (= 0,3—0,35 mg/kg) liegen, augenblicklich zu einer Wiederkehr der gelähmten Reflexe führt, erscheinen uns therapeutische Versuche bei E 605-Vergiftungen, in denen motorische Lähmungen im Vordergrund stehen, durchaus sinnvoll. Im Hinblick auf den spinalen Angriffspunkt von E 605 ist ein Versuch mit Strychnin bei der durch dieses Gift ausgelösten Atemlähmung ebenfalls angezeigt.

Als Ursache der bei der Vergiftung mit Anti-Cholinesterasen auftretenden Atemlähmung sind bisher eine Blockade der neuromuskulären Erregungsübertragung (im Zwerchfell), bronchokonstriktorische Wirkungen und eine vielleicht direkt das Atemzentrum lähmende Wirkung berücksichtigt worden (DE CANDOLE u. Mitarb.). Auf Grund der hier mitgeteilten Ergebnisse muß im Falle der Vergiftung mit E 605 jedoch auch an die Möglichkeit einer die Phrenicuszentren treffenden Rückenmarkslähmung gedacht werden.

Zusammenfassung.

An decerebrierten Katzen wurde die Wirkung von E 605 auf mono- und polysynaptische Rückenmarksreflexe geprüft.

Es zeigte sich, daß bei fortschreitender Vergiftung mit E 605 (1 bis 6 mg/kg i.v.) der aus den meisten Neuronen bestehende kontralaterale Streckreflex wesentlich stärker abgeschwächt wird als der weniger komplizierte homolaterale Beugereflex, während der monosynaptische Patellarsehnenreflex zunächst kaum beeinflusst wird. Mit beginnender Lähmung des polysynaptischen kontralateralen Streckreflexes (etwa 6 mg/kg E 605 i.v.) tritt dann überraschend eine Steigerung des monosynaptischen Patellarsehnenreflexes hervor.

Daß es sich bei diesen Befunden um echte Rückenmarkswirkungen von E 605 handelt, konnte mit Hilfe geeigneter Methoden (tiefspinaler Duretrennung, isoliert durchströmte Extremität usw.) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse synergistischer (z. B. Parpanit) und antagonistischer (z. B. Nicotin und Strychnin) Versuche sprechen dafür, daß E 605 die

Interneuronen des Rückenmarks lähmt. Die beobachtete Steigerung des Patellarsehnenreflexes mag dabei auf einer Lähmung von Interneuronen, die einen hemmenden Einfluß auf diesen Reflex ausüben, beruhen.

Literatur.

- BÜLBRING, E., and J. H. BURN: *J. of Physiol.* **100**, 337 (1941). — BÜLBRING, E., J. H. BURN and C. R. SKOGLUND: *J. of Physiol.* **107**, 289 (1948). — CALMA, I., and S. WRIGHT: *J. of Physiol.* **103**, 93 (1944). — CANDOLE, C. A. DE, W. W. DOUGLAS, C. L. EVANS, R. HOLMES, K. E. V. SPENCER, R. W. TORRANCE and K. M. WILSON: *Brit. J. Pharmacol.* **8**, 466 (1953). — BROOKS, C. McC., and K. KOIZUMI: *The Spinal Cord*, Ciba Foundation Symposium, S. 63. Churchill-Verlag 1953. — CHENNELLS, M., W. F. FLOYD and S. WRIGHT: *J. of Physiol.* **108**, 375 (1949). — DUENSING, F., u. W.-D. ERDMANN: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* (im Druck). — ENDERS, A., u. H. RUF: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **90**, 174 (1952). — ERDMANN, W.-D., H. D. KEMPE u. W. LÜHNING: Noch nicht veröffentlichte Befunde. — HECHT, G., u. W. WIRTH: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **211**, 264 (1950). — HOLMSTEDT, B.: *Pharmakol. Rev.* **6**, 49 (1954). — KOLL, W.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **184**, 365 (1937). — LEHMANN, jr. A.: *Bull. New York Acad. Med.* **25**, 386 (1949). — MERLIS, J. K., and H. LAWSON: *J. of Neurophysiol.* **2**, 566 (1939). — NAEß, K.: *Acta physiol. scand.* **20**, 117 (1950). — RIESSER, O.: *Muskelpharmakologie*, S. 74ff. Bern: Med. Verlag H. Huber 1949. — SALERNO, P. R., and J. M. COON: *J. of Pharmacol.* **95**, 240 (1949). — *Arch. internat. Pharmacodynamie* **84**, 227 (1950). — SKOGLUND, C. R.: *The Spinal Cord*, Ciba Foundation Symposium, S. 195. Churchill-Verlag 1953. — SCHWEITZER, A., and S. WRIGHT: *J. of Physiol.* **89**, 165 (1937). — TAUGNER, R., u. W. CULP: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **220**, 423 (1953). — TAVERNER, D.: *Brit. J. of Pharmacol.* **9**, 84 (1954). — WIKLER, A.: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **58**, 193 (1945); zit. n. TAVERNER (1954).

Dr. W.-D. ERDMANN und Dr. K. P. SCHAEFER, Göttingen,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Professor Dr. med. L. LENDLE).

Hirngefäßreaktionen bei der experimentellen Vergiftung mit E 605 (Diäthyl-p-nitrophenyl-thiophosphat).

Von

H. D. KEMPE.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juni 1954.)

In einer vorangehenden Arbeit haben DUENSING u. ERDMANN den Verlauf der E 605-Vergiftung elektroencephalographisch untersucht. Dabei entstand die Frage nach der Möglichkeit ursächlicher Zusammenhänge zwischen hirnelektrischen Krampfstromabläufen und Durchblutungsveränderungen in bestimmten Hirnarealen.

Bei Krämpfen verschiedener Herkunft ist ein Zusammenhang mit intracerebralen Durchblutungsstörungen vielfach sichergestellt, sei es im konditionalen oder im koordinativen Sinne.

SPIELMEYER und seine Schule vertritt nachdrücklich die zentralvasomotorische Krampfentstehung. Das Auftreten von örtlich begrenzten oder totalen Anämien in Hirnrinde und Thalamus, in anderen Fällen von vermehrter Hirndurchblutung während des Krampfes oder postparoxysmal und von einer Mischung anämischer und hyperämischer Bezirke ist vielfach konstatiert worden (SCHOLZ, MEYER; Lit. siehe dort).

Die therapeutische Beeinflußbarkeit der E 605-Vergiftung mit Atropin könnte, neben der am meisten diskutierten antagonistischen Wirkungsmöglichkeit gegenüber einer Acetylcholinvermehrung infolge Esteraseblockung, auch eine spezifische Wirkung bei Gefäßreaktionen vermuten lassen. EICHHOLTZ u. Mitarb. haben u. a. Gefäßspasmolytika im Antagonismus zu Cocainkrämpfen geprüft.

Im folgenden sollen einige Befunde über das Verhalten der Hirngefäße im akuten Krampf durch E 605 (zum Teil unter Atropin-Vorbehandlung) mitgeteilt werden, die wir mit Hilfe der Benzidinfärbung der Erythrocyten im histologischen Bild nach SLONIMSKI u. CUNGE erhielten.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten 22 weiße Ratten von 195—330 g und 7 Katzen von 550—2350 g Gewicht. E 605 wurde bei der Ratte peroral, bei der Katze intraperitoneal appliziert, jeweils in der Dosierung von 10 mg/kg. Auf der Höhe des Krampfes und bei beginnender Atemstörung und Cyanose erfolgte die Dekapitation. (Andere Tötungsarten sollen nach RÖSSEL u. OSSWALD die Durchblutung des ZNS

stärker beeinflussen.) Rasches und vorsichtiges Freipräparieren des Gehirns, das sofort in das Fixationsgemisch von SLONIMSKI u. CUNGE verbracht wird und für 48 Std dort verblieb. Die Verwendung von reinem 10 oder 20%igem Formalin hat sich uns wegen undeutlicher Darstellung der Capillaren als Fixierungsmittel nicht bewährt. 4 Std wässern. Gefrierschnitte von 150 μ Dicke. Benzidinfärbung. Alkoholreihe, Xylol, Caedax. Die Gefäße stellen sich als schwarze Stränge dar. Haltbarkeit der Präparate etwa 6—10 Wochen, danach häufig Abblassung der feinsten Gefäße.

Ergebnisse.

Von 6 Ratten und 2 Katzen, die keine Pharmaka erhielten, wurden zur Feststellung normaler Gehirndurchblutung histologische Schnitte von Groß- und Kleinhirn und Thalamus hergestellt. Abb. 1 und 3 zeigen je einen Schnitt aus Großhirnrinde und Thalamus einer unbehandelten Ratte bzw. Katze. Alle Abschnitte der Rinde, der weißen Substanz und des Thalamus sind, je nach Intensität ihrer Gefäßversorgung, gleichmäßig durchblutet. Wesentliche Unterschiede in der Durchblutung der verschiedenen Versuchstiere haben wir bei gleichem präparativem Vorgehen nicht gesehen.

Nach Vergiftung mit E 605 bot sich ein vom „Normalen“ deutlich verändertes Bild: In Rinde, Mark und Thalamus fanden sich stark ausgeprägte, fleckige Hyperämien. Bezirke mit zum Teil erheblich erweiterten Capillaren und Arteriolen bzw. Venolen wechselten mit kleineren Abschnitten normaler Durchblutung unregelmäßig ab. Das Kleinhirn war in den meisten Fällen mehr gleichmäßig hyperämisch. An keiner Stelle konnten aber ischämische oder anämische Gebiete festgestellt werden. Die Abb. 2 und 4 zeigen ein histologisches Bild aus dem Großhirn der Ratte und dem Thalamus der Katze nach E 605-Vergiftung.

Wurden die Tiere 15—30 min vor der E 605-Gabe mit Atropin (5 bzw. 2 mg/kg s.c.) vorbehandelt, so ließ sich kein deutlicher Unterschied zum reinen E 605-Bild im Hinblick auf die cerebrale Hyperämie erkennen. Überraschenderweise wurde die Zeit bis zum Krampfbeginn von 1—3 Std auf 45—70 min (Ratten) und von 10—20 min auf 8 bis 12 min (Katzen) bei Vorbehandlung mit Atropin verkürzt.

Es war interessant zu prüfen, ob auch das durch Cholinesterasehemmung cholinergisch wirksame Eserin (Physostigmin) einen Einfluß auf die Gehirndurchblutung hat. Auch bei den im Eserinkampf getöteten Ratten waren die Gefäße, vor allem der Großhirnrinde, deutlich dilatiert und hyperämisch. Vorbehandlung mit Atropin hatte hier 1. einen deutlich krampfverzögernden Effekt und 2. ließ sich im histologischen Präparat eine abschwächende Wirkung auf die durchblutungsfördernde Wirkung des Eserins erkennen.

Vergleichend führten wir Versuche mit den am stärksten wirksamen Krampfgiften Cardiazol und Coramin durch. Nach Injektion dieser Stoffe traten innerhalb von 1—2 min stärkste Krämpfe auf. Im histologischen Bild fand sich in allen Fällen eine sehr ausgeprägte Hyperämie,

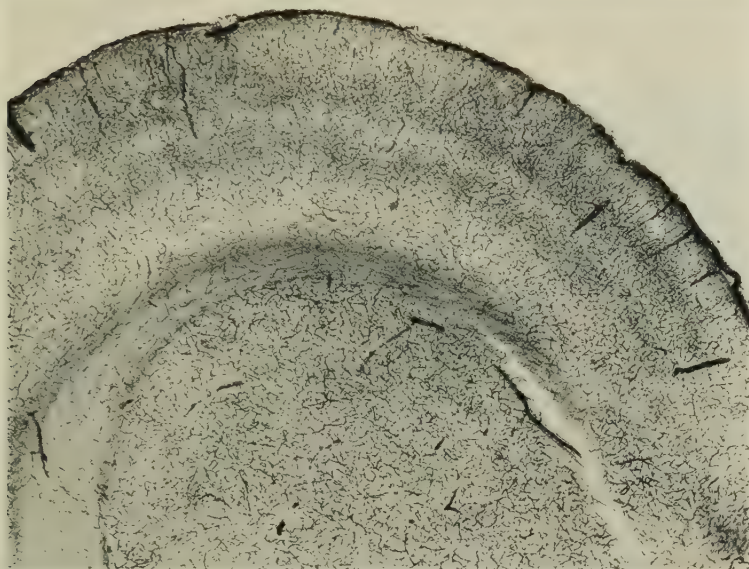


Abb. 1.

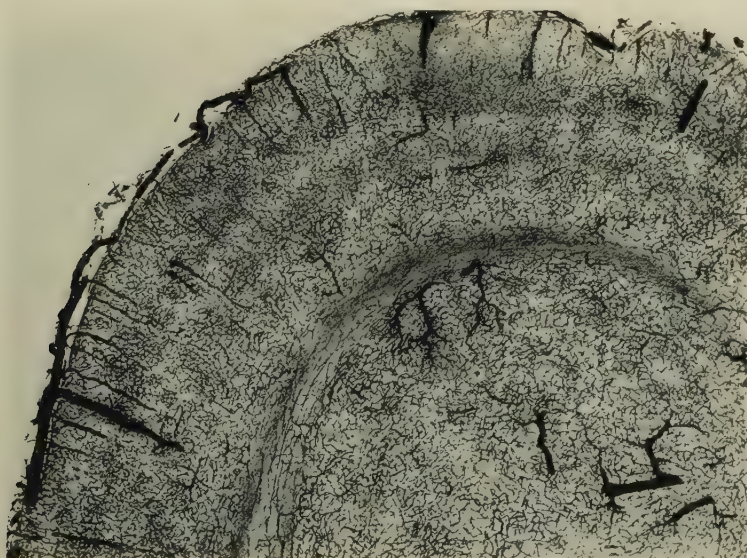


Abb. 2.

Abb. 1 und 2. Blutgefäße aus Großhirnrinde und -mark der Ratte. 1 Unbehandelt. 2 Nach E 605 10 mg/kg per os, Dekapitation auf der Höhe des Krampfes. Deutliche Gefäßerweiterungen. Gefrierschnitte 150 μ . Benzidin-Färbung nach SLONIMSKI u. CUNGE. Silber-Eosin. 40 fach.

besonders in der Rinde von Groß- und Kleinhirn. Durchblutungsausfälle im Sinne allgemeiner oder lokaler Ischämien wurden nicht beobachtet.

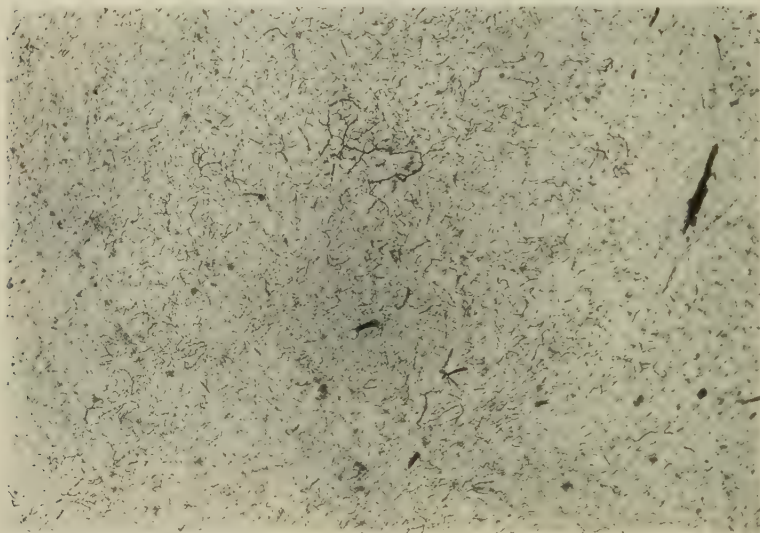


Abb. 3.

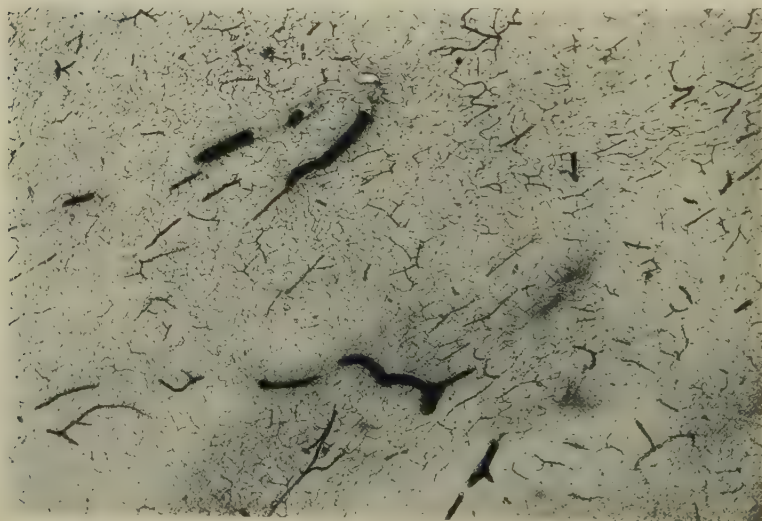


Abb. 4.

Abb. 3 und 4. Blutgefäße aus dem Thalamus der Katze. 3 Unbehandelt. 4 Nach E 605 10 mg/kg intraperitoneal. Dekapitation auf der Höhe des Krampfes. Fleckige Hyperämien. Präparation und Reproduktion wie oben.

Die Tab. 1 gibt Auskunft über Art und Dosis der geprüften Stoffe und über die Zeiten von Injektion bis Krampfbeginn.

Tabelle 1.

	Zahl der Tiere	Krampfgift (Dosen in mg/kg Tier)	Vorbehandlung mit (Dosen in mg/kg Tier)	Zahl der krampf. Tiere	Zeit bis Krampfbeginn	Bemerkung
<i>Ratten</i>	6	—	—	—	—	Kontrolle
(E 605 per os)	7	E 605 (10)	—	6	1—3 Std	1 Tier ohne Krämpfe
	2	E 605 (10)	Atropin (5)	2	45 u. 70 min	
	1	Cardiazol (60)	—	1	2 min	
	2	Coramin (300)	—	2	1 u. 1½ min	
	2	Eserin (0,6)	—	2	6 u. 9 min	
	2	Eserin (0,6)	Atropin (5)	2	25 u. 34 min	
<i>Katzen</i>	2	—	—	—	—	Kontrolle
(E 605 intra- peri- toneal)	2	E 605 (10)	—	2	10 u. 20 min	
	2	E 605 (10)	Atropin (2)	2	8 u. 12 min	
	1	Coramin (300)	—	1	1 min	

Diskussion.

Die Gehirne der im akuten, durch E 605 verursachten Krampfanfall getöteten Versuchstiere zeigten ausgedehnte fleckige Hyperämien in Großhirnrinde, Mark und Thalamus. SIEDECK u. THALER fanden bei der chronischen Vergiftung mit E 605 am Hund deutliche Hyperämien in allen Teilen des ZNS, zum Teil mit Hämorrhagien und Ganglienzellveränderungen, während ENDERS u. RUF nach akuter und chronischer Vergiftung von Ratten und Meerschweinchen keine pathologischen Veränderungen am Gehirn feststellen konnten.

Seitdem E 605 (G. SCHRADER) als Insecticid und Pflanzenschutzmittel frei im Handel erhältlich ist, sind eine Reihe von Vergiftungen beim Menschen beschrieben worden, die zum Teil unter Krämpfen und oft raschem Verlauf zum tödlichen Ausgang führten (TASCHEN u. WIRRIGER, VOGEL, LEONHARDT, JANTZEN). Bei der path.-anat. Untersuchung fiel fast regelmäßig Hirnödeme und Hyperämie der Hirnschnittfläche, der Hirnbasisgefäße, des Plexus chorioideus, ferner Hyperämie der anderen parenchymatösen Organe und gelegentlich Lungenödeme auf. Die beschriebenen Veränderungen sind jedoch nicht als spezifisch für eine E 605-Vergiftung zu deuten.

Die Beobachtung des Vergiftungsverlaufes zeigte, daß der Tod der Tiere unter zentralen Erregungen und Atemlähmung eintrat. In Kontrollversuchen zum Studium des Vergiftungsverlaufes beobachteten wir in Übereinstimmung mit DU BOIS ein Sistieren der Atmung ½—2 min vor dem Herzstillstand.

Vielfach wurde nach Vergiftung mit E 605 und verwandten Stoffen ein vermehrter Acetylcholingehalt im ZNS und in der Peripherie festgestellt und zu den Vergiftungssymptomen in Beziehung gesetzt (CHENNELLS u. Mitarb., DU BOIS u. Mitarb., FRAWLEY u. Mitarb., HECHT u. WIRTH, HERKEN u. Mitarb., STEWART). Dabei fand sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Maß der Gehirnocholinesterase-Hemmung und den zentralen Erregungsvorgängen bzw. der Schwere der Vergiftung. Nach den Untersuchungen von BARNES, DE CANDOLE u. Mitarb. und LUNDHOLM kann die tödliche Atemlähmung verschiedener Phosphorsäureester auf Lähmung des Atemzentrums, Bronchokonstriktion oder neuromuskulärem Block der mot. Zwerchfellsynapsen (WEDENSKY-Hemmung) beruhen. Die Komponenten sind je nach Tierart, Stoff und Dosis verschieden stark ausgeprägt und treten bei einigen Tierarten auch kombiniert auf.

Als Folge der Atemhemmung resultiert bei zunächst noch intakter Herztätigkeit eine zunehmende CO_2 -Vermehrung und Hypoxämie. Diese Veränderungen setzen die bereits verminderte Funktionstüchtigkeit der Atemmuskulatur weiter herab und vermögen selbst zentrale Erregungsvorgänge auszulösen. Die CO_2 -Vermehrung im Blut und Hirngewebe ist nach OPITZ; C. F. SCHMIDT; M. SCHNEIDER; NOELL u. M. SCHNEIDER; M. u. D. SCHNEIDER aber der stärkste Faktor für eine vermehrte Gehirndurchblutung, die über eine Gefäßerweiterung zustande kommt. Die starken Hyperämien im Bereich des Großhirns könnten Ausdruck dieser Regulationen sein. Das vermehrte O_2 -Bedürfnis des Gehirns im generalisierten Krampf (OPITZ; M. SCHNEIDER) vermag den deletären Ausgang der Vergiftung nur noch zu beschleunigen.

Atropin-Vorbehandlung hatte auf den Krampfverlauf und das Durchblutungsbild keinen antagonistischen Einfluß. HECHT u. WIRTH konnten die toxische Wirkung sicher letaler Dosen E 605 an der Maus und Ratte durch 50 mg/kg Atropin, an der Katze durch 1 mg/kg aufheben, allerdings das Auftreten von Krämpfen oder fibrillären Muskelzuckungen dadurch nicht immer verhindern. Unsere Ergebnisse von nur 4 Tieren im antagonistischen Versuch gegen Atropin unterliegen auch einer zu starken Streuung, die bei dieser Beeinflussung gefunden wird.

Möglicherweise kann aber die Verminderung vegetativer Nebenwirkungen (Kollaps etc.) nach Atropinisierung eine erleichterte Resorption und eine weniger durch Lähmungen überdeckte Krampfwirkung auftreten lassen.

In vergleichenden Versuchen fanden wir beim Cardiazol- und Coraminkrampf stark ausgeprägte Hyperämien im Groß- und Kleinhirn.

Übereinstimmend sahen FISCHER u. LÖWENBACH unter dem Einfluß von Cardiazol eine Mehrdurchblutung des Gehirns (1), die von Blutdruckveränderungen nicht abhängig war, ferner eine Verstärkung der Hirnaktionsströme (2). Die Untersuchungen von OSTERWALDT und M. SCHNEIDER (persönliche Mitteilung an LENDLE) ergaben beim Cardiazolkrampf im Gegensatz zu DRESZER u. SCHOLZ keine Durchblutungsänderung im ZNS. Hohe Krampfdosen, wie sie hier verwandt wurden, führen nach HILDEBRANDT zur Lähmung des Vasomotorenzentrums.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der selektiven Erythrocytenfärbung nach SLONIMSKI u. CUNGE wurde im histologischen Bild von Ratten und Katzen das Verhalten der Hirngefäße im Krampfstadium der Vergiftung mit dem Phosphorsäureester E 605 studiert.

2. Besonders in Großhirnrinde, Mark und Thalamus fanden sich deutlich ausgeprägte, fleckige Hyperämien und in keinem Fall Zeichen verminderter Durchblutung.

3. Es wird angenommen, daß die Veränderungen der intracerebralen Durchblutung nicht durch eine spezifische Wirksamkeit des Phosphorsäureesters oder eine Hemmung der Gehirnocholinesterase bedingt, sondern Folgen der durch die Atemlähmung sich entwickelnden Hypoxämie und lokalen CO_2 -Vermehrung sind.

Vorbehandlung mit Atropin hatte keinen antagonistischen Einfluß auf das Krampfgeschehen und die Hirndurchblutung.

4. Vergleichende Untersuchungen mit Cardiazol und Coramin ergaben in allen Abschnitten des ZNS stark ausgeprägte Gefäßerweiterungen und keine Durchblutungsverminderung.

Herrn O. SCHOELL, Zeiss-Winkel, Göttingen, möchte ich für die Anfertigung der Mikroaufnahmen danken.

Literatur.

- BARNES, J. M.: Brit. J. Pharmacol. **8**, 208 (1953). — CHENNELLS, M., W. F. FLOYD and S. WRIGHT: J. of Physiol. **108**, 375 (1949). — DE CANDOLE, C. A., W. W. DOUGLAS and K. E. V. SPENCER: J. of Physiol. **111**, 23 P (1950). — DE CANDOLE, C. A., W. W. DOUGLAS, C. LOVATT EVANS, R. HOLMES, K. E. V. SPENCER, R. W. TORRANCE and K. M. WILSON: Brit. J. Pharmacol. **8**, 466 (1953). — DRESZER, R., u. W. SCHOLZ: Z. Neur. **164**, 140 (1939). — DU BOIS, K. P., u. Mitarb.: J. of Pharmacol. **95**, 79 (1949). — DUENSING, F., u. W.-D. ERDMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. (1954). — EICHHOLTZ, F., u. Mitarb.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **184**, 674 (1937). — Arch. internat. Pharmacodynamie **77**, 127 (1948). — ENDERS, A., u. H. RUF: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 175 (1952). — FISCHER, M. H., u. H. LÖWENBACH: (1) Klin. Wschr. **1934**, 1401. — (2) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **174**, 502 (1934). — FRAWLEY, J. P., E. C. HAGAN and O. G. FITZHUGH: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 156 (1952). — HECHT, G., u. W. WIRTH: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **211**, 264 (1950). — HERKEN, H., u. D. NEUBERT: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **219**, 223 (1953). — HILDEBRANDT, F.: Hdb. d. exper. Pharmacol. **5**, 157 (1937). — JANTZEN, G.: Slg. Vergift.Fälle Arch. Toxikol. **14**, 165 (1952). — LEONHARDT, J.: Slg. Vergift.Fälle Arch. Toxikol. **14**, 395 (1953). — LUNDHOLM, L.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **16**, 345 (1949). — MEYER, J. E.: Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. **1953**, 69. — NOELL, W., u. M. SCHNEIDER: Pflügers Arch. **246**, 181 (1942). — OPITZ, E.: Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. **1953**, 26. — OSTERWALDT, K. H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **198**, 245 (1941). — RÖSSEL, W., u. H. OSSWALD: Pflügers Arch. **254**, 214 (1951). — SCHMIDT, C. F.: Pflügers Arch. **251**, 571 (1949). — SCHNEIDER, M.: Verh. dtsh.

Ges. Kreislaufforsch. **1953**, 3. — SCHNEIDER, M., u. D. SCHNEIDER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **175**, 606 (1934); **175**, 640 (1934). — SCHOLZ, W.: Verh. dtsh. Ges. Kreislaufforsch. **1953**, 52. — SCHRADER, G.: Die Entwicklung neuer Insekticide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphorverbindungen. Weinheim: Verlag Chemie GmbH. 1952. 2. Aufl. — SIEDECK, H., u. H. THALER: Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 194 (1952). — SLONIMSKI, P., u. M. CUNGE: Zbl. Neur. **87**, 561 (1937). — SPIELMEYER, W.: Z. Neur. **148**, 285 (1933); **123**, 536 (1930); **109**, 501 (1927). — STEWART, W. C.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 270 (1952). — TASCHEN, B., u. W. WIRRICHER: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 1478. — VOGEL, G.: Slg. Vergift.Fälle Arch. Toxikol. **14**, 381 (1953).

Dr. H. D. KEMPE, Pharmakologisches Institut der Universität,
Göttingen, Geiststr. 9.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. LENDLE).

Untersuchungen zur Frage der strukturechemischen Verwandtschaft von Morphin und Papaverin mit Hilfe des Nalorphin-Antagonismus*.

Von
H. D. KEMPE.

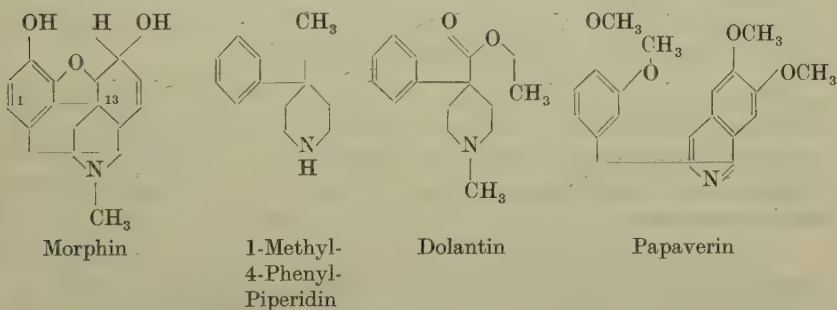
Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Juni 1954.)

Die Synthese des Morphins durch GATES und TSCHUDI (1952) ist der letzte Beweis für die von R. ROBINSON seit 1925 angenommene chemische Struktur des Morphinmoleküls.

Man hatte das Morphin meist als Phenanthrenderivat angesehen, doch lassen sich in ihm ebenso Derivate des (weitgehend hydrierten) Isochinolins, des Piperidins oder des Phenyläthylamins erkennen. O. SCHAUMANN (1949) hat bei der pharmakologischen Untersuchung der morphinähnlich wirkenden Analgetica Dolantin und Polamidon gezeigt, daß die spezifische analgiphore Gruppe des Morphins in der Anordnung des 1-Methyl-4-Phenylpiperidins mit einem zentralen, quaternären C-Atom gegeben ist. LESPAGNOL hat diese Bedeutung vor allem dem zentralen quaternären C-Atom beigemessen. Entscheidend für eine wirksame analgetische Wirkung ist ferner die Methylsubstitution am N-Atom (H. HEIMANN).

Die von SCHAUMANN (1940) angenommene pharmakologisch wirksame Konfiguration kommt in der von ihm modifizierten Schreibweise der Formelbilder besonders deutlich zum Ausdruck:



* Nalorphin = N-allyl-normorphin.

Zum Vergleich sei die Strukturformel von Dolantin beigelegt, dessen Kern 1-Methyl-4-Phenylpiperidin auch im Morphin enthalten ist. Dolantin hat eine dem Morphin sehr ähnliche zentrale analgetische Wirksamkeit und in diesem Dosierungsbereich auch eine depressorische Wirkung auf das Atemzentrum und den Hustenreflex.

Auch das Papaverin ist dem Morphin bei dieser Schreibweise ähnlich. Man kann beide als Isochinolinderivate auffassen, deren Ringsysteme verschieden hydriert und substituiert sind. Es fehlt aber im Papaverinmolekül die 1-Methyl-4-Phenylpiperidin-Konfiguration mit dem zentralen quaternären C-Atom.

Dem Papaverin und verwandten Stoffen wird hauptsächlich eine periphere spasmolytische Wirksamkeit zugesprochen. Doch fanden NIMS u. Mitarb. an Hunden und Katzen eine atmungsanregende Wirkung des Papaverins, die nicht von arterieller Hypotonie abhängig war und nach Denervierung von Carotis-Sinus und Aortenbogen ausblieb. Gelegentlich trat auch eine Atmungshemmung auf. ENDERS u. SCHMIDT (1) nahmen bei gleichem methodischen Vorgehen eine direkte erregende Wirkung auf das Atemzentrum an.

Papaverin und Dolantin haben beide auch eine gewisse lokalanaesthetische Wirkung. Papaverin hat selbst eine, wenn auch nur sehr schwache, analgetische Komponente.

Im therapeutischen Bereich und bei geeigneter Applikationsform können sowohl Papaverin, als auch Morphin und Dolantin blutdrucksenkend wirken, wobei das Dolantin sich hier nicht „morphinähnlich“ verhält, sondern peripher vasodilatierend angreift.

WEIJLARD und ERICKSON (1942) stellten das N-allylnormorphin synthetisch dar, das sich als spezifischer Antagonist des Morphins erwies und seitdem praktisch und theoretisch Bedeutung erlangt hat¹ (ECKENHOFF, HUGGINS, LANDMESSER, UNNA, FROMHERZ). Diese spezifisch antagonistische Wirksamkeit der auch als „Nalorphin“ bezeichneten Substanz² richtet sich auch gegen *morphinähnliche* Analgetika, z. B. Dromoran, Dolantin und Polamidon.

Man nimmt an, daß es am Ort der Einwirkung dieser antagonistisch wirkenden Verbindungen infolge chemischer Ähnlichkeit zu einer Verdrängung („competitive inhibition“) kommt, so daß man aus diesem Verhalten auch Rückschlüsse über die Zugehörigkeit einer gegen Nal geprüften Substanz zur Morphingruppe gezogen hat.

Daher erschien uns Nal als spezifisches Antidot des Morphins auch gegenüber Papaverin geeignet, auf pharmakologischem Wege seine Strukturähnlichkeit mit Morphin zu überprüfen. Im folgenden soll über Untersuchungen zur Frage des Antagonismus von Nal gegen Papaverin berichtet werden.

¹ Die Darstellung des N-allyl-norkodeins durch v. BRAUN 1914 und seine pharmakologische Prüfung durch POHL 1915, der diese Verbindung schon als wirksames Antidot gegen Morphin erkannt hatte, war offenbar in Vergessenheit geraten.

² In dieser Arbeit wird die Abkürzung Nal verwandt.

Neben der Beeinflussung toxischer Papaverindosen durch Nal wurden antagonistische Wirkungen auf Atmung, Kreislauf und an der glatten Muskulatur von Darm und Gefäßen untersucht. Papaverin wurde als Hydrochlorid aus einer Stammlösung 1×10^{-2} verwendet.

Außer dem N-allylnormorphin (Merek¹) stand uns für die Versuche auch das N-allyl-Derivat des Dromorans² (Hoffmann-La Roche¹) zur Verfügung, das sich als Antidot gegen Dromoran und Morphin als gleichermaßen wirksam erwies (FROMHERZ).

1. Beeinflussung toxischer Papaverindosen durch Nal bzw. NaD an Maus und Ratte.

Nach ENDERS und SCHMIDT (2) liegt die LD 50 des Papaverins bei der i.p.-Injektion an der Ratte bei 70 mg/kg. Meine Vorversuche ergaben eine letale Dosis zwischen 70 und 100 mg/kg bei i.p. Applikation.

Die Injektion von 100 mg/kg i. p. führte an der Ratte zu folgendem akuten Vergiftungsbild: Nach $1\frac{1}{2}$ —2 min traten Ataxie, Steilstellung des Schwanzes, Opisthotonus, Dyspnoe, Seitenlage, etwas später Reflexlosigkeit und Atemlähmung bei noch schlagendem Herzen auf. Exitus letalis erfolgte nach 7—22 min. Vor- und Nachbehandlung (zum Teil kombiniert) mit Nal in Dosen von 0,3—15,0 mg/kg i. p. hatte an der Ratte *keinen Einfluß* auf den Ablauf der Vergiftung bzw. ihren letalen Ausgang.

Intraperitoneale und s.c. Injektionen toxischer und noch nicht sicher toxischer Papaverindosen führten bei 15 von 27 Ratten innerhalb von 2—22 min zur Steilstellung des Schwanzes (ähnlich dem STRAUBSchen Zeichen an der Maus nach Morphininjektion). Sie wurde durch Nal *nicht* beeinflußt.

An der Maus löste Papaverin 1—70 mg/kg in keinem Falle das Schwanzphänomen aus. Mit 70 mg/kg begannen Vergiftungssymptome wie Seitenlage, Dyspnoe, Blässe von Haut und Schleimhäuten. Bei Morphin war der Effekt mit Sicherheit zu erzielen: Nach Dosen von 0,2—0,5 mg/Maus trat innerhalb 6—12 min die Schwanzreaktion sehr deutlich auf. Nal 2 mg/kg i. p. (entsprechend 0,05 mg/Maus bei einem durchschnittlichen Tiergewicht von 25 g) hob in wenigen Minuten diese Reaktion völlig auf; geringere Dosen waren entweder nicht wirksam oder schwächten nur ab. Die Dauer der Nal-Wirkung betrug in 5 Fällen 37—60 min, in 3 Fällen bestand sie während der ganzen Beobachtungszeit von $2\frac{1}{2}$ Std.

Die Tatsache, daß bei den Mäusen auch mit Papaverindosen, die bereits eine Dyspnoe auslösten, kein Schwanzphänomen verursacht wurde, spricht gegen die mögliche Deutung, das Schwanzphänomen sei eine Erstickungsfolge, die durch Nal am gelähmten Atemzentrum nicht aufgehoben werden könnte.

¹ Für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen sei den Herstellerfirmen gedankt.

² In vorliegender Arbeit als NaD bezeichnet.

Zur Prüfung einer etwaigen Eigenwirkung von Nal wurden Ratten innerhalb 35 min bis zu 38 mg/kg i.p. (mit größter Einzeldosis von 20 mg/kg) injiziert. Sie wurden reaktionslos vertragen.

2. Atmungs- und Blutdruckwirkungen.

Im Vordergrund der Morphinvergiftung steht die akute zentrale Atemlähmung. Die rasche und zuverlässige Aufhebung dieses bedrohlichen Zustandes durch Nal-Injektionen ist nicht nur tierexperimentell mehrfach bestätigt worden, sondern hat auch in der Klinik Beachtung gefunden (LANDMESSER, COBB u. CONVERSE; ECKENHOFF, HOFFMANN u. DRIPPS). Dieser Antagonismus bestand auch gegen Derivate des Morphins und verwandte Verbindungen, die in höheren Dosen ebenfalls atemlähmende Eigenschaften hatten (HUGGINS, GLASS u. BYRAN; LANDMESSER u. Mitarb.; ECKENHOFF u. Mitarb.; OSTERWALDT; BORNSTEIN, YORBURG u. JOHNSTON). Aus diesem Verhalten hat man auch Pharmaka, die sich nicht direkt vom Morphin ableiten, zu den morphinartigen Verbindungen gezählt.

In unseren Versuchen am Meerschweinchen (vgl. Teil 4 b) kam es in 2 Fällen durch eine zu rasche bzw. toxische intravenöse Papaverininjektion (15 mg bzw. 4×10 mg/kg) nach initialer Atemfrequenzsteigerung zur Schnappatmung. In beiden Fällen führte die i.v. Injektion von je 0,1 mg/kg NaD zu normaler Atemtätigkeit innerhalb 1–2 min. Die Nachprüfung am Hund erfolgte unter Registrierung von Atmung und Blutdruck.

Methodik. An 9 Hunden (9–13,5 kg) wurde in Chloralose-Urethan-Narkose (0,08/kg und 0,25/kg i.v.) die Atemfrequenz mit einer MAREYSchen Kapsel und das Minutenvolumen mit der Gasuhr nach GLDEMEISTER registriert. Blutdruckkanüle in der A. femoralis. Der li. Halsvagus wurde durchschnitten und am zentralen Stumpf eine Elektrode angelegt. Mit Hilfe des Reizgerätes „Megatest“¹, das die unabhängige Einstellung von Impulsfrequenz, Impulsdauer und Stromstärke gestattet, wurde im Abstand von 3 min eine „zentrale Vagusreizung“ ausgeführt. Bei einer Reizung läßt sich eine lähmende oder erregende Wirkung eines injizierten Stoffes auf das Atemzentrum aus Verstärkung oder Aufhebung des Hemmeffektes durch Vagusreiz erkennen. Reizdaten: 20–30 sec⁻¹, 0,2 msec, 5–15 mA; Reizung jeweils 20 sec lang. Alle Substanzen wurden i.v. injiziert.

2–20 mg/kg Papaverin verursachten regelmäßig eine erhebliche Steigerung der Atemfrequenz und des geförderten Atemvolumens, die jeweils nur von kurzer Dauer war und in 2 Fällen von einer geringen Atemfrequenzverminderung gefolgt war. Gleichzeitig mit der Injektion kam es stets zu einer Blutdrucksenkung, welche innerhalb 1–3 min auf den Ausgangswert zurückkehrte. Ebenso fanden ENDERS u. SCHMIDT (1) an Hunden, bei denen nach der Methodik von HEYMANS die Receptoren

¹ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Überlassung dieses Reizgerätes.

von Carotis-Sinus und Aorta operativ ausgeschaltet waren, nach i.v. Injektion von 25 mg Papaverin eine zentral bedingte Atmungserregung, die von einer kurzfristigen Blutdrucksenkung nicht abhängig war.

Wegen der nur außerordentlich kurz andauernden Wirkung des Papaverins im Gegensatz zum Morphin (siehe unten) wurde durch eine

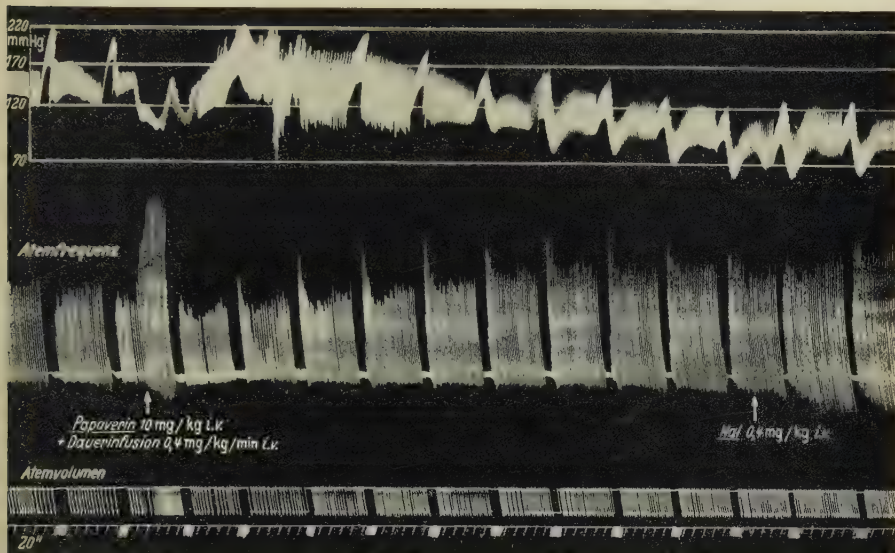


Abb. 1. ♀ Hund, 9 kg. Narkose: Chloralose (0,08 g/kg)-Urethan (0,25 g/kg). Vagotomie li. Registrierung von oben nach unten: Blutdruck, Atemfrequenz, Atemvolumen (125 cm³/Teilstrich), Zeitschreibung 20 sec, Markierung: afferente Vagusreizung. Rasch abklingende Atemerregung nach Injektion von 10 mg/kg Papaverin i.v. In die anschließende Dauerinfusion von Papaverin wurde 0,4 mg/kg Nal injiziert, das bis auf eine geringe Verminderung des zentralen Vagusreizerfolges keinen Effekt zeigte.

protrahierte Applikation versucht, einen länger anhaltenden Effekt auf die Atmung zu erzielen: Im Anschluß an eine Papaverininjektion von 5 mg/kg wurde 0,4 mg/kg/min dauerinfundiert. Nach rasch abgeklungener Atmungsexcitation resultierte so eine langsam ansteigende Vermehrung von Atemfrequenz und Volumen. Nun konnte Nal (0,3—0,5 mg/kg) injiziert werden, es war ohne Wirkung auf Atmung und Kreislauf (Abb. 1). Eine geringe Hemmung des zentralen Vagus-Reizerfolges könnte für eine gewisse erregende Eigenwirkung auf das Atemzentrum sprechen. In einem anderen Falle war Nal $2 \times 0,3$ mg/kg in der Prüfung auf Eigenwirkung ohne jeden Effekt auf Atmung, zentralen Vagusreizerfolg und Blutdruck.

Morphininjektionen von 5 und 10 mg/kg hatten eine anhaltende Atemhemmung bzw. Atemstillstand zur Folge. (Traten starke Blutdrucksenkungen auf, so wurden diese Versuche für die Beurteilung der Atmungswirkung des Morphins nicht mit

herangezogen.) Nal 0,3—0,5 mg/kg hob stets die Hemmung sofort auf (Abb. 2). Nal und Morphin verhalten sich also in ihren antagonistisch wirksamen Dosen wie 1:10 bis 1:30. Nachfolgende Morphininjektionen blieben jetzt ohne Erfolg.

An dieser Stelle mag auch auf einige Beobachtungen über Morphin-Blutdruckwirkungen hingewiesen werden. Im allgemeinen gilt Morphin primär nicht als blutdruckwirksam; so schreibt GREMELS bei der Morphinvergiftung am Kaninchen eine Blutdruckwirkung weniger einer direkten

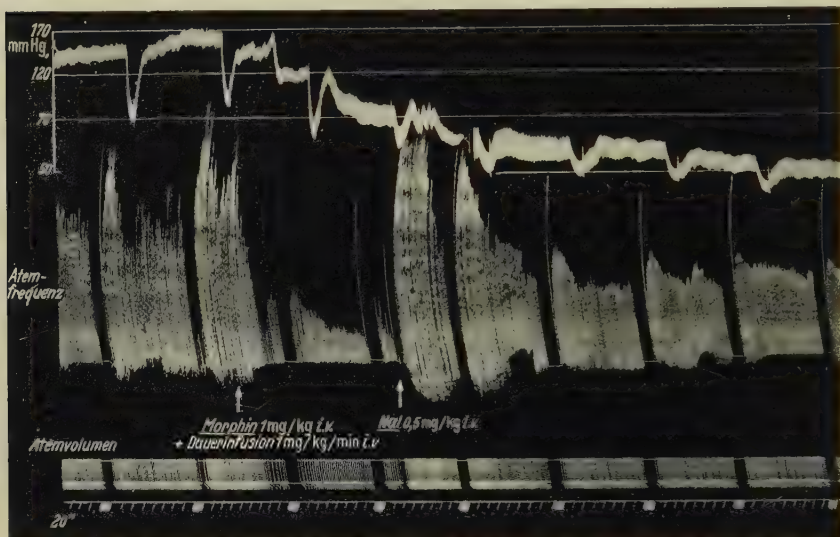


Abb. 2. ♂ Hund, 7,5 kg. Chloralose-Urethan-Narkose. Vagotomie li. Morphin 1 mg/kg i.v. mit anschließender Dauerinfusion von 1 mg/kg/min hat eine deutlich depressorische Wirkung auf die Atmung. Sofortige Aufhebung der Hemmung durch Nal 0,5 mg/kg. Keine Beeinflussung der Morphin-Blutdrucksenkung!

Vasomotorenlähmung als einer Atemlähmung zu. Ich beobachtete aber bei i.v. Injektionen größerer Teildosen im Anfangsstadium der Versuche neben einer vorübergehenden Atemregung eine starke Blutdrucksenkung, die nur langsam reversibel war und Atemwirkungen überlagern konnte. Aus diesem Grunde bin ich dazu übergegangen, Morphin in kleiner Erstdosierung zu verabreichen und eine Verstärkung durch anschließende Dauerinfusion zu erzeugen, bei der eine Blutdrucksenkung nur allmählich auftrat (siehe z. B. in Abb. 2). Unter beiden genannten Bedingungen wurde durch Nal kein antagonistischer Effekt am Blutdruck erzielt.

3. Wirkungen am isolierten Gefäßpräparat.

Methodik. Kaninchen-Ohrgefäß-Präparat nach KRAWKOW u. PISSEMSKI. Eine Gefäßwirksamkeit läßt sich durch Änderungen der Durchflußgeschwindigkeit oder der Empfindlichkeit gegen injizierte Einzeldosen von Histamin oder Adrenalin

erkennen. Ist unter Papaverinperfusion z. B. eine 20fach höhere Histamindosis notwendig, um den gleichen gefäßverengernden Effekt wie vor der Perfusion zu erzielen, so wird die Abschwächung der Histaminempfindlichkeit mit 1:20 angegeben usw.

Papaverin wirkte an 6 Ohrpräparaten in den geprüften Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-6} deutlich gefäßdilatierend und schwächte den Histamintest auf 1 : 20 bis 1 : 400 ab. Wurde dann Nal selbst in Konzentrationen von 10^{-4} bis 10^{-5} zusammen mit Papaverin perfundiert, so ergab sich keine Änderung der Durchflußgeschwindigkeit oder des Histamintestes im Vergleich mit den Verhältnissen bei der reinen Papaverindurchströmung. Bei einem Antagonismus wäre eine Abnahme der Perfusionsgeschwindigkeit oder eine Hemmung der Histaminabschwächung zu erwarten gewesen. Nach Rückschaltung auf RINGER-Perfusion war die Papaverinwirkung meist voll reversibel.

Bei Konzentrationen von 10^{-5} bis 3×10^{-5} des Nal allein bestand keine Änderung von Durchströmung und Histaminempfindlichkeit. Mit 10^{-4} begann eine lähmende Wirkung aufzutreten.

4. Darmwirkungen *in vivo* und *in vitro*.

Den beiden wichtigsten Alkaloiden des Opiums, Morphin und Papaverin, kommt eine Darmwirksamkeit zu, die therapeutisch ausgenutzt wird. In neuerer Zeit fanden GRUBER u. GRUBER, WILLIAMS u. STREETEN, KEWITZ, REMMER u. ENGELHARDT am Dünndarm *in situ* von Mensch und Hund nach Morphin Tonussteigerung und verzögerte oder aufgehobene Peristaltik. Nach STRAUB lähmt aber Morphin am isolierten Meerschweinchendünndarm den Tonus; die Peristaltikhemmung soll nur durch den mit der Tonusenkung einhergehenden mangelnden Füllungsreiz auf die Darmwand eintreten.

GRUBER u. GRUBER prüften auch das Nal im Hinblick auf seinen Morphinantagonismus am Darm: Äquivalente Dosen von Nal einerseits und Morphin und Derivaten andererseits wirkten an diesem Organ deutlich antagonistisch. Den gleichen Befund mit NaD geben FROMHERZ u. PELLMONT (1953) für den Meerschweinchendarm *in situ* an. Auf drei verschiedenen Wegen wurde nun versucht, die Frage auch für das Papaverin zu klären.

Methodik. a) Untersuchungen am isolierten Meerschweinchen- und Kaninchen-darmpräparat nach MAGNUS. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Inhalt des Badgefäßes von 25 cm³. Die Wirkungen waren nach Auswaschen meist völlig reversibel.

b) Prüfung der genannten Substanzen am Meerschweinchendarm *in vivo* nach STRAUB u. VIAUD (5 Meerschweinchen). Narkose: 1,1 g Urethan/kg 1½ Std vor Operationsbeginn. Die Stoffe wurden stets i.v. injiziert. Stufenweise Belastung des Darmes zur Bestimmung des Peristaltikreizes und der Tonuslage; zum Teil Registrierung der Peristaltik bei konstanter Füllung über einen längeren Zeitabschnitt. Aus den gefundenen bzw. errechneten Werten wurde die Beziehung zwischen Füllungsvolumen und Füllungsdruck graphisch dargestellt, um so außer der Beeinflussung des Peristaltikreflexes auch Tonuswirkungen zu erkennen.

c) An 4 Hunden und 1 Katze wurde in Chloralose-Urethan-Narkose (0,08 bzw. 0,06/kg und 0,25/kg) eine Gummiballon in das obere Jejunum eingebunden und die Darmautomatie mittels MAREYScher Kapsel am Kymographion registriert. Zugleich Blutdruckregistrierung. Injektion der Stoffe i.v. (V. femoralis).

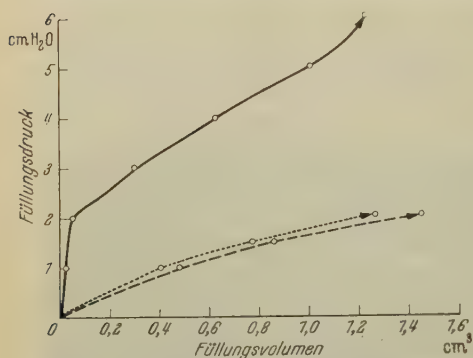


Abb. 3. Volumendehnungskurve des Meerschweinchendarmes in situ nach STRAUB. Auf der Abszisse ist das Füllungsvolumen des Darmes in cm^3 , auf der Ordinate der Füllungsdruck in $\text{cm H}_2\text{O}$ aufgetragen. Bei $\rightarrow$ Auftreten der Peristaltik. — Kontrolle. - - - - - Papaverin 10 mg/kg i.v. führt zu Tonusabnahme; Peristaltikreflex schon bei niedrigem Füllungsdruck auslösbar. Nal 0,4 mg/kg i.v. beeinflusst die Papaverinwirkung nicht.

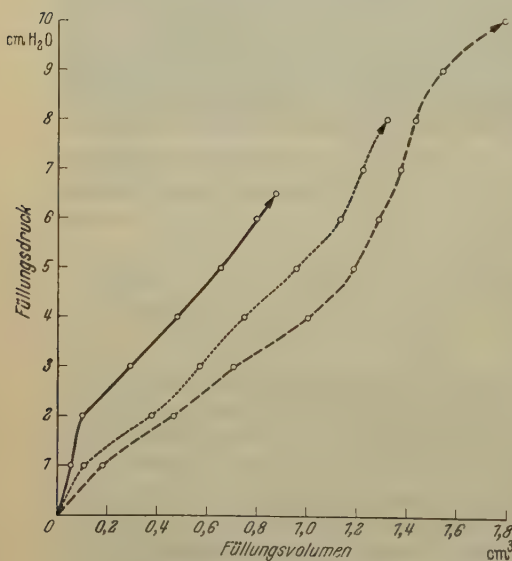


Abb. 4. Volumendehnungskurve (wie in Abb. 3). — Kontrolle. - - - - - Morphin 0,1 mg/kg i.v. senkt den Tonus und läßt die Peristaltik erst mit größerem Füllungsdruck und -volumen auftreten. Nal 0,2 mg/kg i.v. wirkt antagonistisch und verbessert im Versuch die Peristaltik.

Zu a: Isolierter Meerschweinchendarm nach MAGNUS. Für die Versuche wurden Dünndarmabschnitte von 4 Meerschweinchen und 2 Kaninchen ferner der Dickdarm von 1 Meerschweinchen verwandt.

Papaverin senkte am Dünndarm ab 1/400000 den Tonus und führte zur Abnahme bzw. in höheren Konzentrationen zur Aufhebung der Pendelbewegungen. Nal hatte von 1/1,25 Mill. bis 1/12500 keinen Einfluß auf die Papaverinhemmung. Nal und NaD waren ohne Eigenwirkung auf das Darmpräparat.

Am Meerschweinchencolon war die für eine Wirkung notwendige Papaverin-Konzentration mit 1/1 Mill. geringer. Auch hier bestand kein Antagonismus von Papaverin und Nal, während dieser sich für Morphin deutlich zeigen ließ. Nal 1/1,25 Mill. hob hier die Wirkung von Morphin in gleicher Konzentration auf.

Zu b: Meerschweinchendarm in situ nach STRAUB und VIAUD. Papaverin hatte ab 5 mg/kg eine deutliche Tonusenkung zur Folge. Der Peristaltikreiz war in den meisten Fällen erst auf höhere Füllungsdrucke auslösbar. Gelegentlich trat er aber schon

bei niedrigeren Füllungsdrucken, wohl infolge stärkeren Füllungsvolumens, auf. Nal ließ jedoch, nach eingetretener Papaverinwirkung injiziert, in Dosen von 0,1 bis 0,4 mg/kg diese Tonus- und Peristaltikveränderung völlig unbeeinflusst. Die Abb. 3 zeigt ein Beispiel eines solchen Versuches.

Morphin hatte schon mit 0,1 mg/kg einen tonussenkenden und peristaltikverzögernden Effekt. Hier ließ sich deutlich ein Antagonismus nachweisen, wie beispielsweise Abb. 4 zeigt. Schon FROMHERZ u. PELLMONT berichteten über die Aufhebung der Hemmwirkung des Morphins auf den Peristaltikreflex durch NaD.

Auch hier prüften wir erneut Nal auf eine Eigenwirkung. Die Volumendehnungskurven liegen unmittelbar neben der Kontrollkurve. In 3 Fällen wirkte Nal 0,2 mg/kg selbst gering hemmend auf Tonuslage und Peristaltikreflex.

Ganz anders lagen die Verhältnisse beim NaD, welches eine erregende Eigenwirkung auf das STRAUBSche Darmpräparat zeigte. Schon 0,05 mg/kg führten zu Tonussteigerung und verbesserter Peristaltik, die auch bereits auf geringe Füllungsdrucke auslösbar war. Diese NaD-Wirkung war auch nach der hemmenden Wirkung von 10 mg/kg Papaverin voll vorhanden. Bei fortlaufender Registrierung unter konstantem Füllungsdruck waren andererseits 20 mg/kg Papaverin notwendig, um den Effekt von 0,05 mg/kg NaD aufzuheben. Am MAGNUSSchen Darmpräparat wurde diese Wirkung des NaD nicht beobachtet. Im Rahmen unserer Untersuchungen lassen sich diese Unterschiede, auch zwischen Nal und NaD, nicht erklären.

Zu c: Registrierung der Dünndarmautomatie mittels Ballon an Hund und Katze. 5 und 10 mg/kg Papaverin bewirkten am Hund Tonusabfall und Hemmung bzw. Aufhebung der spontanen Automatie. Nal konnte in Dosen von 0,3 bis 1,0 mg/kg diese Wirkungen in keinem Fall beeinflussen.

Den Antagonismus zum Morphin haben wir in 3 Hundeversuchen bestätigen können. Ab 5 mg/kg Morphin kam es zu Tonusverlust (in einem Fall starker Tonusanstieg!) und Peristaltikhemmung. Nal 0,3 bis 2,0 mg/kg hob diese Wirkungen, teils nur vorübergehend, auf. 1 Hund wurde nach einer Einzelinjektion von 1 mg/kg Morphin mit 1 mg/kg/min Morphin 60 min lang dauerinfundiert. Nach initialer Peristaltiksteigerung kam es 4 min später bei zunehmendem Tonusverlust zu völliger Aufhebung der Peristaltik. 0,5 mg/kg Nal bewirkte umgehend eine normale Tonushöhe und regelmäßige Peristaltik, die trotz weiterlaufender Morphin-Dauerinfusion bis Versuchsende konstant blieb.

An der Katze konnte der Morphinantagonismus des Nal unter den gleichen Bedingungen nicht demonstriert werden. Möglicherweise hat eine Freisetzung von pressorischen Substanzen aus dem Nebennierenmark, wie sie EVANS u. Mitarb. nach Morphininjektionen an der Katze gefunden haben, die Morphinwirkung am Darm noch verstärkt und eine Nal-Wirkung nicht auftreten lassen.

Die Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. *Darm in situ von Hund und Katze (Narkose: Chloralose-Urethan) Ballon im Dünndarm. Applikation der Substanzen i.v. Darmwirkungen von Morphin, Papaverin und Nal.*

Tier	Stoff	Dosis mg/kg	Wirkung auf		Anta- gon.	Dosis mg/kg	Wirkung auf	
			Tonus	Peristaltik			Tonus	Peristaltik
1. Hund 9,3 kg ♂	Papaverin	10	Verminde- rung	gelähmt	Nal	0,3	∅	∅
2. Hund 7,5 kg ♂	Papaverin	5 + 10	—	gelähmt	Nal	1,0	∅	∅
3. Hund 11,5 kg ♀	Papaverin	10	Verminde- rung	gelähmt	Nal	0,5	∅	∅
	Morphin	10	starker An- stieg	gelähmt	Nal	bis 2,0	Vermind. auf Ausg.- lage	bleibt gelähmt
4. Hund 7,5 kg ♂	Morphin	5	kurzfr. An- stieg, danach deutl. Ver- minderung	vermin- dert bis gelähmt	Nal	0,5	Anstieg auf Ausg.- lage	deutlich verstärkt
Katze 2,3 kg ♀	Morphin	0,1	—	verstärkt				
		+0,3 1,0	starke Ver- minderung	gelähmt	Nal	0,3	∅	∅

5. Wirkung von Nal gegen Apomorphin.

Das Apomorphin hat durch den Fortfall der Sauerstoffbrücke am Phenanthrenkern und eine veränderte Stellung des Piperidinringes nur noch eine entfernte strukturchemische Verwandtschaft mit Morphin. Durch diese Veränderungen im Molekül ist auch die Anordnung des quaternären C-Atoms mit seiner 4-Phenylpiperidin-Konfiguration verschwunden, die für die spezifische Morphinwirkung verantwortlich ist.

Im Zusammenhang mit unserer Frage nach der Verwandtschaft von Morphin und Papaverin, die mit Hilfe des Nal geprüft wurde, erschien es interessant, auch das Apomorphin in die Untersuchung mit einzu-beziehen.

0,05 mg/kg Apomorphin i. m. lösten am Hund innerhalb 2—8 min Erbrechen aus. Vorbehandlung (15—20 min vor Apomorphin) mit Nal 0,2 bis 3,0 mg/kg i. m. oder NaD 0,1 bis 10,0 mg/kg i. m. bewirkten in keinem Falle der untersuchten 11 Hunde Abschwächung oder Aufhebung des Apomorphinerbrechens.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von UNNA überein, der keine Beeinflussung der Apomorphinwirkung am Hund (Erbrechen) und Kaninchen (Erregung) nach Vorbehandlung mit 10 mg/kg Nal fand.

In der Prüfung auf eine mögliche Eigenwirkung waren 3 mg/kg Nal i. m. am Hund ohne Effekt, während 10 mg/kg NaD i. m. in einem Falle Speichelfluß und Zittern hervorrief. Höhere Dosen wurden nicht geprüft, weil sie auch therapeutisch am Menschen keine Anwendung finden.

Erörterung der Befunde.

Es war die Frage aufgenommen worden, ob Nal auch dem Papaverin gegenüber die gleiche antagonistische Wirkung auszuüben vermag wie gegenüber Morphin.

RADOFF und HUGGINS beschrieben das gleiche Verhalten gegen Dolantin. Auch gegen Polamidon, das nicht unmittelbar zu den Morphinderivaten gehört, besteht ein solcher Antagonismus. So berichtete OSTERWALDT von 2 schweren Polamidonvergiftungen beim Menschen, bei denen es zum Koma, Reflexverlust einschließlich der Cornealreflexe und zu schweren Atemstörungen gekommen war, daß intravenöse Nal-Injektionen (40 bzw. 25 und 10 mg) sofort wirksam waren.

Daß in den vorgelegten Befunden Nal die Atemwirkung des Papaverins nicht aufzuheben vermochte, könnte seine Ursache darin haben, daß Papaverin in allen Dosen von 2—20 mg/kg selbst eine erregende Atmungswirkung besitzt. Diese Feststellung ist schon von ENDERS und SCHMIDT, GOLDBERG und SHAPERO, NIMS, SEVERINGHAUS und COMROE getroffen worden. Erst mit hohen Dosen von 30 mg/kg Papaverin kam es in unseren Versuchen zu akutem Blutdruckabfall und Atemstillstand, die durch Nal nicht aufgehoben werden konnten.

Beim Morphin beobachteten wir gleichfalls keine Aufhebung der Blutdrucksenkung durch Nal nach einmaliger i.v. Injektion großer Dosen; das steht in Übereinstimmung mit HUGGINS, GLASS und BRYAN.

C. F. SCHMIDT und LIVINGSTON nahmen für die Blutdrucksenkung nach intravenösen Morphingaben bei Säugetieren in erster Linie eine periphere gefäßdilatierende Wirkung an. Nach EVANS, NASMYTH und STEWART soll an der Katze das Morphin am Vasomotorenzentrum angreifen. GREMELS hält die Kreislaufwirkung des Morphins am Kaninchen dagegen für sekundär durch die Atmungshemmung bedingt. Gegen diese Auffassung würde unser Versuch (am Hund) in Abb. 2 sprechen, in dem die Atmungshemmung nach Morphin durch 0,5 mg/kg Nal schlagartig beseitigt, die Blutdrucksenkung von 150 auf 60 mm Hg jedoch nicht beeinflußt wurde.

Am Meerschweinchendarm nach STRAUB begannen lähmende Wirkungen von 5 mg/kg Papaverin i.v. aufzutreten. Diese Dosis steht im auffallenden Widerspruch zu den Angaben von STRAUB u. OZAKI und BORNHANN u. LOESER. Diese Autoren injizierten das Papaverin subcutan bzw. i.m. und fanden 150—300 mg/kg ohne deutliche Wirkung auf den Meerschweinchendünndarm. Nach den Untersuchungen von BROCK u. Mitarb. und ISSEKUTZ u. Mitarb. fällt Papaverin als schwerlösliche Base, sowohl an der Injektionsstelle im Gewebe, als auch bei in vitro-Versuchen mit Phosphatpuffergemischen oder Blutserum leicht aus. Dies bedingt Verzögerungen der Resorption, wodurch eine Wirkung unzuverlässig wird.

Bei unseren in vivo-Versuchen ergab sich kein Antagonismus von Nal zur Papaverinlähmung; Nal hemmte aber in Kontrollversuchen deutlich die Morphinwirkungen.

In unsere Versuche mit einbezogen wurde das Apomorphin als Abkömmling des Morphins. Nal und NaD konnten das Apomorphin-erbrechen des Hundes nicht abschwächen oder aufheben.

Zusammenfassung.

N-allylnormorphin, das gegen Morphin und verwandte Analgetica antagonistisch wirkt, erschien geeignet, in der Prüfung gegen Papaverin die strukturechemische Verwandtschaft der beiden Hauptalkaloide des Opiums, Morphin und Papaverin, mit Hilfe pharmakologischer Prüfung zu beurteilen.

Papaverin wurde in seiner Wirkung auf Atmung, Blutdruck (Hund und Katze) und am isolierten Gefäß, am Darm in situ und in vitro studiert. Ferner wurde seine Toxizität an der Ratte ermittelt. Eine Beeinflussung dieser Wirkungen durch N-allylnormorphin wurde *nicht* gefunden. Der bekannte Antagonismus zum Morphin ließ sich bestätigen.

Somit verhält sich Papaverin pharmakologisch nicht „morphinähnlich“, was zu den strukturechemischen Unterschieden beider Alkaloide stimmt.

Literatur.

- BORNMAN, G., et A. LOESER: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 332 (1949). — BORNSTEIN, M., L. YORBURG and B. JOHNSTON: J. Amer. Med. Assoc. **151**, 908 (1953). — BRAUN, J., v.: Ber. chem. Ges. **47**, 2312 (1914). — BROCK, N.: Dtsch. med. Wschr. **1951**, 474. — BROCK, N., D. LORENZ u. H. BARTLING: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 512 (1952). — ECKENHOFF, J. E., G. L. HOFFMANN and R. D. DRIPPS: Anesthesiology **13**, 242 (1952). — ENDERS, A., u. L. SCHMIDT: (1) Arch. internat. Pharmacodynamie **91**, 157 (1952). — (2) Arzneimittel-Forsch. **2**, 221 (1952). — EVANS, A. G. J., P. A. NASMYTH and H. C. STEWART: Brit. J. Pharmacol. **7**, 542 (1952). — FROMHERZ, K., u. B. PELLMONT: Experientia (Basel) **8**, 394 (1952). — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **218**, 136 (1953). — GATES, M., and G. TSCHUDI: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1109 (1952). — GILDEMEISTER, M., u. W. HEUBNER: Z. exper. Med. **13**, 291 (1921). — GOLDBERG, A. A., and M. SHAFERO: J. Pharmacy a. Pharmacol. (Lond.) **6**, 236 (1954). — GREMELS, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **162**, 29 (1931). — GRUBER, C. M. jr., and C. M. GRUBER: J. of Pharmacol. **109**, 157 (1953). — HELMANN, H.: Z. exper. Path. u. Ther. **17**, 342 (1915). — HUGGINS, R. A., W. H. GLASS and A. R. BRYAN: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 540 (1950). — Arch. internat. Pharmacodynamie **86**, 112 (1951). — ISSEKUTZ, B. v., M. LEINZINGER u. Z. DIRNER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **164**, 158 (1932). — KEWITZ, H., H. REMMER u. H. ENGELHARDT: Klin. Wschr. **1951**, 570. — S. A. PISSEMSKI: Arch. f. Physiol. **156**, 426 (1914). — LANDMESSER, C. M., S. COBB and J. G. CONVERSE: Anesthesiology **14**, 535 (1953). — LESPAGNOL, A.: in R. HAZARD, Actualités pharmacologiques, 3. Serie. Paris: Masson et Cie.

1951. — MAGNUS, R.: Arch. f. Physiol. **102**, 123, 349 (1904); **103**, 515, 525, (1904). — NIMS, R. G., J. W. SEVERINGHAUS and J. H. COMROE jr.: Brit. J. Pharmacol. **109**, 58 (1953). — OSTERWALDT, K. H.: Slg. Vergift. F. Arch. Toxikol. **14**, 349 (1953). — POHL, J.: Z. exper. Path. u. Ther. **17**, 370 (1915). — RADOFF, L. M., and S. E. HUGGINS: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 879 (1951). — ROBINSON, R.: zit. nach P. KARRER, Lehrbuch d. organ. Chemie. Leipzig: Thieme 1950. — SCHAUMANN, O.: Pharmazie **4**, 364 (1949). — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **196**, 109 (1940). — STRAUB, W., u. MASAMICHI OZAKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **173**, 374 (1933). — STRAUB, W., u. P. VIAUD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 1 (1933). — UNNA, K.: J. Pharmacol. **79**, 27 (1943). — WEIJLARD, J., and A. E. ERICKSON: J. Amer. Chem. Soc. **64**, 869 (1942). — WILLIAMS, E. M. V., and D. H. P. STREETEN: Brit. J. Pharmacol. **6**, 263 (1951).

Dr. H. D. KEMPE, Pharmakologisches Institut der Universität,
Göttingen, Geiststr. 9.



4113212

COUNTWAY LIBRARY



HC BEGM

